

**Zur chemischen Struktur der Glykosidsäuren
von
Ipomoea turpethum L.**

Gerald Wenzel

1977

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Zur chemischen Struktur der Glykosidsäuren

von

Ipomoea turpethum L.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

des

Fachbereichs Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Gerald Wenzel

aus

München

Juni 1977



1. Berichterstatter: Professor Dr. H. W a g n e r

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. E i d e n

Tag der mündlichen Prüfung: 27.7.1977

Herrn Professor Dr. H. Wagner danke ich sehr herzlich
für die Anregung und stets großzügige Unterstützung
dieser Arbeit.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
E I N L E I T U N G	1
A L L G E M E I N E R T E I L	2
A. <u>Allgemeine Übersicht</u>	2
I. Chemosystematik	2
II. Kurzkettige Fettsäuren der Convolvulaceen . .	4
III. Bisher identifizierte Hydroxyfettsäuren der Convolvulaceen	6
IV. Biosynthese von Hydroxyfettsäuren	9
V. Bisherige Isolierungsmethoden	11
VI. Bis heute strukturell aufgeklärte oder weit- gehend aufgeklärte Glykosidsäuren	13
B. <u>Chemische Untersuchung des Harzes von Ipomoea turpethum L.</u>	16
I. Darstellung der Rohglykolipide	17
II. Alkalische Hydrolyse und Bestimmung der kurz- kettigen Fettsäuren des Glykosidharzgemisches	17
III. Isolierung der Glykosidsäuren	19
IV. Aufklärung der Strukturen der Hydroxyfett- säuren der Turpethumglykoside	23
V. Spektrendiskussion der Hydroxyfettsäuren der Zonen I, II, III und IV	27
C. <u>Synthesen.</u>	43
I. Synthese des Methylesters der natürlich vor- kommenden 3,12-Dihydroxypentadecansäure . . .	43
II. Syntheseweg für die Darstellung des 4,12-Di- hydroxyhexadecansäuremethylesters	45
D. <u>Qualitative und quantitative Zuckeranalyse</u> . . .	48
E. <u>Gaschromatographische Untersuchung der Hydroxy- fettsäuren des Petroläther- und Ätherextraktes von Ipomoea turpethum L.</u>	57
Z U S A M M E N F A S S U N G	58

EXPERIMENTELLER THEIL	59
A. Herkunft der Droge	59
B. Allgemeine Arbeitsmethoden	59
C. Physikalische Untersuchungen	62
D. Gewinnung der Glykosidsäuren aus <i>Ipomoea turpethum</i> L.	63
E. Chemische Untersuchungen	67
F. Synthesen	73
G. m-Inosithexaacetat	76
H. Petroläther- und Ätherextrakt	76
LITERATURVERZEICHNIS	77

E I N L E I T U N G

Mit dem Rizinusöl haben die Glykosidharze der Ipomoea- und Convolvulus-Gattung zwei Eigenschaften gemeinsam: Beide Produkte enthalten als Wirkprinzipien Ester bzw. Äther von Hydroxyfettsäuren mit Polyalkoholen und beide gehören in die Gruppe der Dünndarm anregenden Abführmittel. Während sich das Rizinusöl als Arzneimittel behaupten konnte, findet man die Glykosidharze wegen ihrer schweren Standardisierbarkeit nur noch in einigen Pharmakopöen. Außerdem ist bisher die Struktur dieser komplex zusammengesetzten Harze bzw. der daraus durch Alkalihydrolyse gebildeten Glykosidsäuren noch zum großen Teil unbekannt.

Die zur Zeit im eigenen Arbeitskreis bereits erfolgreich begonnenen Versuche, einfache Glykosidsäuren mit Abführwirkung zu synthetisieren, setzen eine genaue Kenntnis der Strukturen der verschiedenen natürlich vorkommenden Glykosidsäuren voraus.

Die vorliegende Arbeit setzt die Arbeit von zwei vorangegangenen Untersuchungen über die Glykosidharze der Ipomoea- und Convolvulus-Gattung fort. Sie hat zum Ziel, die chemische Struktur der Glykosidharze der alten Abführdroge Ipomoea turpethum L. zu klären. Die Strukturaufklärung sollte sich vor allem auf den Hydroxyfettsäure- und den Saccharid-Anteil der Glykosidsäuren konzentrieren.

A L L G E M E I N E R T E I L

A. Allgemeine Übersicht

I. Chemosystematik

Die Vertreter der Convolvulaceenfamilie sind hauptsächlich krautige Pflanzen oder Sträucher. Nach HEGNAUER (1) unterteilt man die Familie in die Cuscutoiden und in die Convolvuloideen. Von den Convolvuloideen sind die zwei wichtigsten und artenreichsten Genera die Convolvuleen und die Ipomeen (2). Chemotaxonomisch betrachtet sind die Glykosidharze als die charakteristischen, chemischen Merkmale der Familie anzusehen. Sie sind einzigartig in ihrer chemischen Zusammensetzung im gesamten Pflanzenreich. Von ähnlichem Aufbau, aber mit geringerer Molekulargröße, anderen Zuckern und anderen Hydroxyfettsäureanteilen sind die Glykolipide aufgebaut, die aus niederen Pflanzen, wie z.B. *Pseudomonas aeruginosa* (3), *Torulopsis apicola* (4), *Candida bogoriensis* und *Ustilago zeae* (5,6,7) isoliert worden sind. Die Harzglykoside sind nicht in allen Teilen der Pflanze in der gleichen Konzentration vorhanden. Aus diesem Grund müssen chemische Untersuchungen von taxonomischer Aussage von allen Pflanzenteilen durchgeführt werden. Die Harzglykoside sind in den Blättern(8), Samen (9) und am häufigsten in Wurzeln nachgewiesen worden. Die für diese Glykoside charakteristischen Hydroxyfettsäuren sind mit nur ganz wenig Ausnahmen im gesamten Pflanzenreich bisher nicht mehr gefunden worden. Neben den auch "Glykoretine" genannten Harzglykosiden wurden in der Familie auch Alkaloide, Polyphenole, Cumarine, Lignane, ätherische Öle und die ubiquitär auftretenden Flavonoide nachgewiesen (1). Als Reservestoffe sind in den unterirdischen Organen Stärke, Mannit und in der von uns bearbeiteten Droge, *Ipomoea turpethum*, I n o s i t gespeichert.

Die Glykoretine sind aus drei Bausteinen aufgebaut, den kurzkettigen Fettsäuren ($C_2 - C_5$), den Zuckern und den Mono- bzw. Dihydroxyfettsäuren ($C_{10} - C_{18}$). Die Hydroxyfettsäuren bilden das Aglykon des Moleküls, während an die Zucker die kurzkettigen Fettsäuren esterartig geknüpft sind (10). Mehrere derartig aufgebaute Moleküle wiederum bilden durch weitere Esterbildung untereinander ein Makromolekül von Molegewichten zwischen 6000 und 10 000. Acylglykoside, wie sie hier vorliegen, sind im Pflanzenreich schon mehrfach nachgewiesen worden. Man findet sie z.B. in der Klasse der Saponine, Herzglykoside, Flavonoidglykoside, Xanthonglykoside und einfachen Phenolderivate. Einige Acylglykoside sind wegen ihrer ausgeprägten pharmakologischen Wirkung von großer Bedeutung. Die Harzglykoside der Convolvulaceen besitzen starke abführende Eigenschaften und wirken wie das Rizinusöl auf den Dünndarm. Sie gehören in die Gruppe der "drastisch" wirkenden Abführdrogen. Das von MANNICH et al. (10) für das genuine Harzglykosid von *Ipomoea purga* (= *Exogonium purga* Benth.) entworfene Aufbauschema (Abb. 1) kann als Prototyp für alle anderen Verbindungen dieser Stoffgruppe gelten.

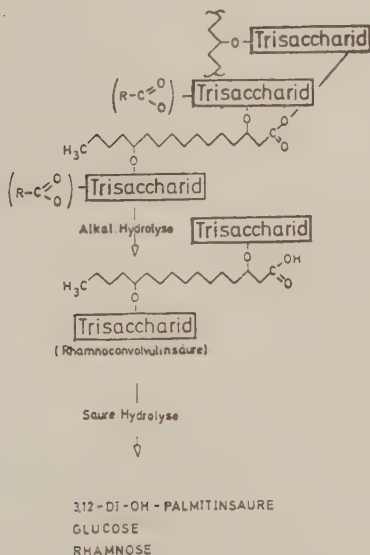


Abb. 1

Demnach erhält man aus den Makromolekülen durch Alkalihydrolyse zunächst die Glykosidsäuren, wobei gleichzeitig die kurzkettigen Fettsäuren abgespalten werden. Durch anschließende saure Hydrolyse erfolgt Abbau zu den Aglykonen und Zuckern.

II. Kurzkettige Fettsäuren der Convolvulaceen

Bis heute wurden in der Convolvulaceen-Familie elf verschiedene kurzkettige Fettsäuren gefunden. Die in den einzelnen Genera aufgefundenen Fettsäuren sind in Tab. 1, S. 5, zusammengestellt.

Die kurzkettigen Fettsäuren sind nicht nur Bausteine der Glykosidharze der Convolvulaceen, sondern sie können auch Bausteine der Cumarine, Iridoide, Flavonoidglykoside, Terpenalkohole und Triterpensäuren sein. Auch am Aufbau einiger Makrolidantibiotika, wie z.B. dem Carbomycin, sind kurzkettige Fettsäuren beteiligt.

T a b e l l e 1

Kurzkettige Fettsäuren der Harzglykoside der Convolvulaceen

	Essigsäure	Propionsäure	Buttersäure	Isobuttersäure	Valeriansäure	Isovaleriansäure	Methyläthyllessigsäure	Tiglinsäure	n-Caprionsäure	Nilsäure (α -Methyl- β -hydroxy-buttersäure)	Trimethyllessigsäure
<i>Convolvulus microphyllus</i> Sieb. ex. Spreng.	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>Convolvulus scammonia</i> L.											
a) Äther unlösl. Anteil	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
b) Äther lösl. Anteil	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Ipomoea fistulosa</i> Mart. et Choisy	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>Ipomoea muricata</i> (L.) Jacq.	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Ipomoea operculata</i> Martin	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
<i>Ipomoea orizabensis</i> (Pellet) Ledanois											
a) Äther unlösl. Anteil	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
b) Äther lösl. Anteil	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Ipomoea parasitica</i> (HBK) Don.	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Ipomoea purga</i> Hayne	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Ipomoea purpurea</i> (L.) Roth	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Ipomoea quamoclit</i> L.	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>Ipomoea simulans</i> Hanbury	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>Merremia tuberosa</i> (L.) Rendle	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
<i>Operculina macrocarpa</i> (L.) Urban											
a) Äther unlösl. Anteil	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
b) Äther lösl. Anteil	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
<i>Pharbitis Nil</i> Choisy	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-

III. Bisher identifizierte Hydroxyfettsäuren der Convolvulaceen

Eine Zusammenstellung der bisher im Pflanzen- und Tierreich aufgefundenen Hydroxyfettsäuren findet man bei REHM (11) und POHL et al. (12).

Die verschiedenen Hydroxyfettsäuren unterscheiden sich voneinander in der Kettenlänge und in der Anzahl sowie Stellung der Hydroxylgruppen. Bei den Monohydroxyfettsäuren ist die Position der Hydroxylgruppe am C_{11} und eine Kettenlänge von 16 Kohlenstoffatomen bevorzugt. Wie aus Tab. 2, S. 7, zu ersehen ist, wurde die 11-Hydroxypalmitinsäure (Jalapinolsäure) bisher am häufigsten unter den Monohydroxyfettsäuren nachgewiesen.

Bei den Dihydroxyfettsäuren befindet sich eine Hydroxylgruppe immer am C_3 , während die zweite Hydroxylgruppe sowohl die C_{11} - als auch die C_{12} -Position einnehmen kann (Tab. 3, S. 8).

Eine Ausnahme bildet die im Jalapenharz nachgewiesene Exogonsäure (Abb. 2), die eine 3,6,6,9-Dioxidodecansäure darstellt und als Gemisch von vier Stereoisomeren vorliegt. Die Brasioliolsäure, eine Trihydroxymyristicinsäure ist bisher nur einmal von SHELLARD (13) bei seinen Untersuchungen über *Ipomoea purga* entdeckt worden.

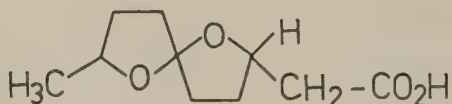


Abb. 2

Exogonsäure

T a b e l l e 3

Dihydroxyfettsäuren	Convulvul. scammonia L.	Ipom. fistulosa Mart. et Choisy	Ipom. leari Paxt.	Ipom. operculata Martin	Ipom. orizabensis (Pellet) Ledanois	Ipom. purga Hayne	Ipom. purpurea (L.) Roth	Merrem. tuberosa (L.) Rendle	Opercul. macro- carpa (L.) Urban	Pharbitis Nil Choisy
3,11-Dihydroxytetradecansäure (ipurolsäure)	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+
										
3,11-Dihydroxyhexadecansäure	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
										
3,12-Dihydroxyhexadecansäure (Operculinol säure)	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
										

IV. Biosynthese von Hydroxyfettsäuren

Die Hydroxyfettsäuren können grundsätzlich als Nebenprodukte der Fettsäurebiosynthese oder als Folgeprodukte der Fettsäureoxidation entstehen. In Pflanzen hat man beide Synthesewege gefunden (14,15). Der erste besteht in einer Hydroxylierung von langkettigen, gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren, wobei der Sauerstoff des Wassers benötigt wird. Durch β -Hydroxylierung von Fettsäure CoA-Verbindungen entstehen 3-D-Hydroxyfettsäuren. Diese Hydroxylierung in Gegenwart von molekularem Sauerstoff wird durch eine "mixed function" Oxygenase katalysiert. Daneben existiert noch eine Hydroxylierung von freien Fettsäuren an einem ω -,cis-6,cis-9-Diensystem, die in Gegenwart von molekularem Sauerstoff und Lipooxygenase zu ω -6- oder ω -10-Hydroperoxyderivaten führt. Im Gegensatz zu dem bei Rizinus-Samen existierenden Hydroxylierungsmechanismus findet bei *Claviceps purpurea* die Hydratisierung der Linolensäure unter anaeroben Bedingungen statt. In diesem Fall stammt die Hydroxylgruppe wiederum aus dem Wasser und nicht von molekularem Sauerstoff. Ein ähnlicher Hydratisierungsmechanismus erzeugt bei Bakterien in einer stereospezifischen Reaktion eine 10-Hydroxystearinsäure, wobei in diesem Fall die Hydratisierung reversibel zu sein scheint.

Bei der Biosynthese von Hydroxyfettsäuren werden zuerst die Monohydroxyfettsäuren gebildet, anschließend erfolgt die Glykosidierung und in zeitabhängiger Folge werden dann erst weitere Hydroxylgruppen über eine "mixed function" Oxygenase in die Kette eingeführt, wie ABREU-GROBOLS et al. (16) bei der Biosynthese der "Heterocystglykolipide" von *Anabena cylindrica* zeigen konnten.

Die Hydroxyfettsäuren können auch durch oxidativen Abbau, hauptsächlich α - oder β -Oxidation entstehen. Hierzu wird molekularer Sauerstoff benötigt. Die α -Hydroxyfettsäuren sind zwar im Pflanzenreich weit verbreitet, machen aber nur einen geringen Anteil aus. Zwei verschiedene Wege der α -Oxidation bei Pflanzen sind beschrieben worden. Nach MARKOVETZ et al. (17) scheint bei den Erdnußkotyledonen ein Peroxidasenprozeß vor-

zuliegen, der ein Wasserstoffperoxid erzeugendes System voraussetzt. Der andere, den HITCHCOCK et al. (15) im Blattgewebe nachgewiesen haben, benötigt nicht Wasserstoffperoxid, sondern molekularen Sauerstoff. In beiden Fällen wurden Hydroxysäuren isoliert, die optisch aktiv waren und 2-D-Hydroxysäurenenantiomere darstellten. Neuere Untersuchungen von SHINE et al. (18) zeigen, daß möglicherweise auch ein gemeinsames Biosynthesystem für beide Wege existiert. Sie nehmen an, daß durch eine von einem Flavoprotein katalysierte Oxidation ein 2-Hydroperoxid als Zwischenprodukt erzeugt wird, das zur 2-Hydroxysäure reduziert oder dann zum C_{n-1} Aldehyd decarboxyliert werden kann, wobei die 2-L-Hydroxysäure an dem α -Oxidationsprozeß nicht beteiligt ist. Durch die α -Oxidation können z.B. die α -Hydroxyfettsäuren, die die Hauptbestandteile der Glykolipide des Gehirns darstellen, entstehen.

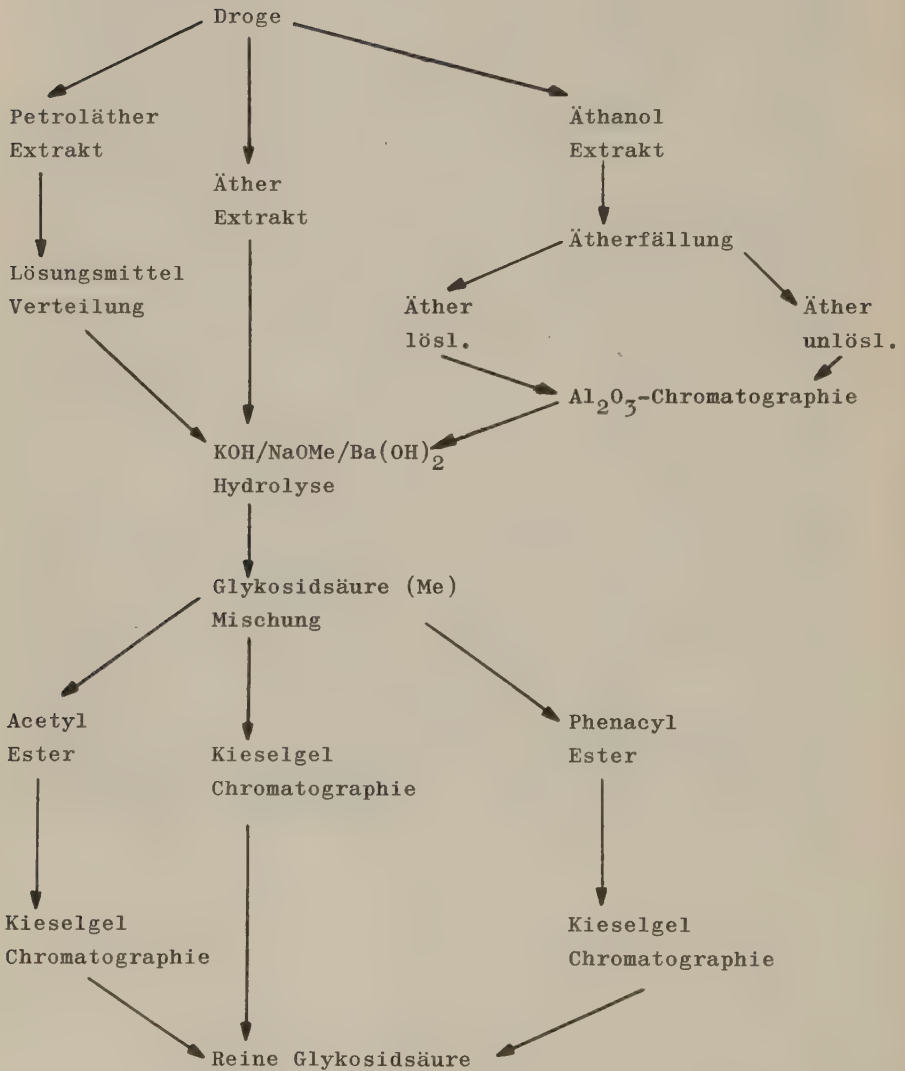
Der wichtigste Abbaumechanismus der Fettsäuren ist die β -Oxidation. Vier Reaktionsschritte sind dazu erforderlich. Zuerst erfolgt eine Dehydrierung an den C-Atomen 2 und 3 und anschließend eine Wasseranlagerung an die entstandene 2,3-trans-Doppelbindung. Durch nochmalige Dehydrierung der L- β -Hydroxyacyl-CoA-Verbindung und Spaltung der entstandenen β -Ketoacyl-CoA-Verbindung entsteht unter Bildung von Acetyl-CoA und des CoA-Esters die um zwei C-Atome verkürzte Fettsäure (19,20). Wahrscheinlich als Nebenprodukte entstehen dabei die β -Hydroxyfettsäuren (14). Die β -Oxidation der wichtigsten natürlich vorkommenden Hydroxyfettsäure, Rizinolsäure, haben HUTTON et al. (21) gründlich untersucht.

V. Bisherige Isolierungsmethoden

Die Arbeitskreise, die sich bisher mit der Isolierung von Glykosidsäuren beschäftigt haben, sind nach verschiedenen Methoden vorgegangen. VOTOCEK et al. (22) und AUTERHOFF et al. (23) unterteilten die Harze in ätherunlösliche, ätherlösliche (22) und petrolätherlösliche (23) Fraktionen. Andere extrahierten mit Äthanol (9,24) oder Methanol (25) und fällten anschließend mit Bleiacetatlösung. HOEHNEL (26) extrahierte mit Äthanol und fällte dann mit essigsaurem Wasser. KROMER (27) und SCHWARTING (28) extrahierten das Harz nur mit Äther. SARIN et al. (29) extrahierten zuerst mit Äther und unterwarfen den Extrakt dann einer Lösungsmittelfraktionierung. LEGLER (8) extrahierte mit wässrigem Methanol und Chloroform, worauf die Chloroformphase durch Fällern mit Isopropanol in zwei Fraktionen geteilt wurde. Nach der Extraktion wurden durch alkalische Hydrolyse mit Bariumhydroxidlösung oder Natriummethylatlösung die kurzkettigen Fettsäuren freigesetzt und isoliert. Die anschließende Reinigung der Glykosidsäuren erfolgte durch Kieselgel-Aluminiumoxidchromatographie (24,25,28,23) oder Chromatographie an Aktivkohle/Celite (8). Einige Arbeitsgruppen haben für die chromatographische Reinigung an Kieselgel die Glykosidsäuren in ihre Methylester (28), Acetyler (25) oder p-Phenyl-phenacyl-ester (24) überführt. Nach der Reinigung wurden die Glykosidsäuren bzw. deren Derivate durch Hydrolyse mit Mineralsäuren, meistens Schwefelsäure, in die Aglykone und Zucker gespalten.

Die folgende Abbildung gibt die bisher wichtigsten Isolierungsmethoden in einem Schema wieder (Schemabild 1, S. 12).

Schemabild 1



VI. Bis heute strukturell aufgeklärte oder weitgehend aufgeklärte Glykosidsäuren

Die erste Strukturaufklärung einer Glykosidsäure gelang erstmals im Jahre 1967 KHANNA und GUPTA (30). Sie isolierten eine Glykosidsäure aus *Ipomoea muricata* Jacq. und nannten sie Muricatin B. Die dabei erhaltenen Spaltprodukte waren die 11-Hydroxyhexadecansäure (Jalapinolsäure) und als Zuckerkomponenten 2 Mol Rhamnose. Erst durch weitere Untersuchungen in unserem Arbeitskreis konnte die anfangs falsch angegebene Zuckerverknüpfung eindeutig bestimmt werden. Bei dem Muricatin B (Abb. 3) handelt es sich um eine 11- 4- O- α - L-Rhamnopyranosyl- α -L- rhamnopyranosyl-oxyhexadecansäure. Die Struktur konnte mittlerweile durch die Synthese in unserem Laboratorium bewiesen werden (31).

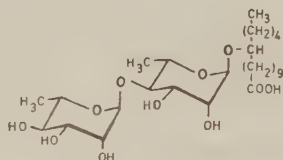


Abb. 3

Muricatin B

In den folgenden Jahren konnten von verschiedenen Arbeitskreisen weitere Glykosidsäuren isoliert und deren Struktur angegeben werden. In unserem Arbeitskreis gelang KAZMAIER (25) die Aufklärung der Struktur der Operculinsäure (Abb. 4).

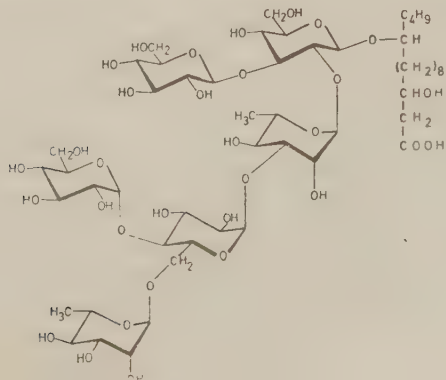


Abb. 4

Operculinsäure

Die jüngste Arbeit auf diesem Gebiet stammt ebenfalls aus unserem Arbeitskreis. SCHWARTING (28) konnte die Strukturen der Microphyllinsäure aus *Convolvulus microphyllus* (Abb. 5) und die der Orizabinsäuren B und C (Abb. 6) aus *Ipomoea orizabensis* genau angeben. Bei der Quamoclitssäure aus *Ipomoea quamoclit* handelt es sich um 0- α -L-Rhamnopyranosyl-0- α -L-rhamnopyranosyl-0- α -L-rhamnopyranosyl-0- β -D-fucopyranosyl-0-jalapinolsäure.

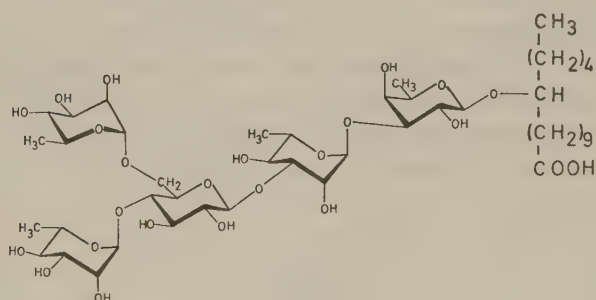


Abb. 5

Microphyllinsäure

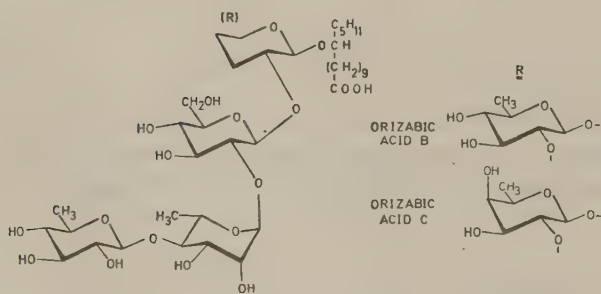


Abb. 6

Orizabinsäuren

Die bisher durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß die meisten Glykosidsäuren der Convolvulaceen Di-, Tetra-, Penta- oder Hexasaccharide enthalten. Die Glykosidsäure aus *Ipomoea purga* stellt als bisher einzige Ausnahme ein Monoglykosid dar. Ein Disaccharid liegt im Muricatin B (30) vor. Die Gruppe der Tetraglykoside wird durch die Orizabinsäuren, Glykoside B und C, repräsentiert (28). Pentaglykoside stellen die Microphyllinsäure (28) und die von OKABE et al. (33) isolierte Pharbitinsäure C dar. Die Rhamnoconvolvulinsäure (25) und die Pharbitinsäure D(33) sind mit je einem Hexasaccharidanteil die bisher zuckerreichsten Glykosidsäuren, die isoliert wurden.

Als Zuckerbausteine treten die D-Glucose, L-Rhamnose, D-Fucose und die D-Quinovose auf. Die häufigste Zuckerverknüpfung bei den D-Zuckern hat β -Konfiguration. Bei den beiden Orizabinsäuren (Abb. 6, S. 14) sind alle vier Zucker β -glykosidisch verknüpft. Alle übrigen bisher strukturell aufgeklärten Glykosidsäuren enthalten sowohl α -glykosidische als auch β -glykosidische Verknüpfungen. Als zwischenglykosidische Bindungen sind die 1 $\rightarrow$ 2, 1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4 und 1 $\rightarrow$ 6 Verknüpfungen bekannt.

Bei zwei der bisher gefundenen Glykosidsäuren sind die Zucker wie bei den Orizabinsäuren linear angeordnet. Bei den anderen Glykosidsäuren hat der Zuckeranteil einen verzweigt-kettigen Aufbau.

Die Hydroxyfettsäuren haben eine Kettenlänge von 10 - 16 Kohlenstoffatomen, wobei der Oligosaccharidanteil bei den Monohydroxyfettsäuren mit der freien Hydroxylgruppe, bei den Dihydroxyfettsäuren mit immer nur einer Hydroxylgruppe, und zwar im allgemeinen mit der am Methylende nahestehenden, verknüpft ist. Die freien Hydroxylgruppen der Zucker sind mit den kurzkettigen Fettsäuren (2-5 Kohlenstoffatome) und untereinander vermutlich mit anderen Hydroxyfettsäuren verestert, sodaß Makromoleküle mit einem Molekulargewicht bis zu 10 000 entstehen. Eine Rein-Isolierung der genuinen Verbindungen ist wegen der hohen Molekulargewichte und des hohen Veresterungsgrades nicht möglich. Die Untersuchung der Glykosidsäuren kann sich daher nur auf eine Untersuchung der einzelnen Bausteine dieser Makromoleküle beschränken.

B. Chemische Untersuchung des Harzes von *Ipomoea turpethum* L.

Ipomoea turpethum L. oder auch *Operculina turpethum* L. (34) ist eine Convolvulaceen-Art, die zu den Genera mit krautigem Habitus gehört. Die meisten Arten wachsen in den Tropen beider Hemisphären. Die von uns bearbeitete Art kommt allerdings nur in Indien vor. *Ipomoea turpethum* L. stellt eine große, mehrjährige Pflanze dar, die in ganz Indien bis in eine Höhe von 900 m verbreitet ist und teilweise auch als Gartenzierpflanze angebaut wird. Die Blätter haben verschiedene Formen, die weißen Blüten sind röhren- oder auch glockenförmig. Sehr selten treten die Blüten auch als Blütenstand auf. *Ipomoea turpethum* L. liefert die indischen Jalapen-Wurzeln, die als sog. weiße (safed nisoth) und schwarze (krishna nisoth) Variante in den Handel kommen. Die Droge wird ähnlich den anderen als Purgans verwendet und immer in gepulverter Form gehandelt. Die weiße Variante wird der schwarzen vorgezogen, da die schwarze zu drastisch wirkt und außerdem Erbrechen, Schwäche und Schwindel hervorruft. Die Aufnahme des brasilianischen Jalapenharzes und der brasilianischen Jalapenknollen (*Ipomoea operculata* Mart. und *Ipomoea tuberosa* L.) in den Deutschen Arzneimittel-Codex (35) zeigt, daß die Glykoretine auch heute noch pharmazeutische Verwendung finden.

Bisher wurden Untersuchungen der Turpethum-Glykoside von VOTOCEK et al. (22) und AUTERHOFF et al. (23) durchgeführt. VOTOCEK et al. (22) konnten im ätherlöslichen Anteil von *Ipomoea turpethum* eine Oxysäure $C_{16}H_{33}O_3$, als Zucker Rhodeose (D-Fucose), aber keine kurzkettigen Fettsäuren nachweisen. AUTERHOFF et al. (23) beschrieben im ätherunlöslichen Anteil von *Ipomoea turpethum* ein Turpethin, im ätherlöslichen das β -Turpethin und im petrolätherlöslichen das α -Turpethin. Sie konnten im Gegensatz zu VOTOCEK (22) bei allen drei Harzglykosiden nach der Hydrolyse Glucose und Rhamnose nachweisen.

Als kurzkettige Fettsäuren fanden sie ein Valeriansäuregemisch und, Turpethin ausgenommen, die Tiglinsäure. Die Aglykone der drei Glykosidsäuren werden von ihnen als Turpetholsäure, α -Turpetholsäure und β -Turpetholsäure bezeichnet. Über ihren chemischen Aufbau werden keine Angaben gemacht.

I. Darstellung der Rohglykolipide

Das gelblich - braun aussehende, getrocknete und grob pulverisierte Turpethum-Harz (36) wurde zuerst mit Petroläther, dann mit Äther und schließlich mit Methanol am Soxhlet erschöpfend extrahiert. Der dunkelbraune Eindampfrückstand war, wie in der Literatur bereits berichtet (23), mit ca. 20% des eingesetzten Harzes bei der Methanolfraction am größten. Aus diesem Grund konzentrierten wir unsere Untersuchungen zunächst auf diese Fraktion.

II. Alkalische Hydrolyse und Bestimmung der kurzkettigen

Fettsäuren des Glykosidharzgemisches

Früher wurden die glykoretinhaltigen Rohprodukte durch Hydrolyse mit Barytwasser in die Glykosidsäuren und die kurzkettigen Fettsäuren gespalten. Wir hydrolysierten jedoch nach der wesentlich schonenderen, bereits von KAZMAIER (25) angewendeten Natriummethylatmethode mit 1N-Natriummethylatlösung (pH 9) über 12 Stdn. bei 4⁰C und anschließend 2 Stdn. lang bei Raumtemperatur. Eine mögliche Alkali katalysierte Zersetzung wird dadurch weitgehend vermieden. Mit dieser Methode erhält man quantitativ die Glykosidsäure- und kurzkettigen Fettsäuremethylester in einem Arbeitsgang (siehe Abb. 7, S. 18).

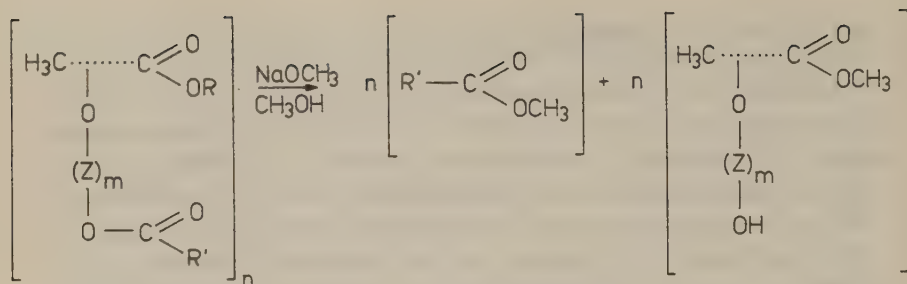


Abb. 7

R': Alkyl-Rest

R': -CH₃

R': -CH₂-CH₃

R': -(CH₂)₂-CH₃

R': -CH-(CH₃)₂

R': -(CH₂)₃-CH₃

R': -CH₂-CH-(CH₃)₂

R': -CH-CH₂-CH₃
|
CH₃

R': -(CH₂)₄-CH₃

R': -C=CH-CH₃
|
CH₃

R': -CH-CHOH-CH₃
|
CH₃

Fettsäuremethylester

Essigsäuremethylester

Propionsäuremethylester

Buttersäuremethylester

Isobuttersäuremethylester

Valeriansäuremethylester

Isovaleriansäuremethylester

Methyläthyllessigsäuremethylester

Capronsäuremethylester

Tiglinsäuremethylester

Nilsäuremethylester

Z = Zucker

R = Veresterung

Die methanolische Alkalilösung wurde nach der Hydrolyse mit Essigsäure bzw. Salzsäure neutralisiert und mit Wasser verdünnt. Die Abtrennung der kurzkettigen Fettsäuren und der Glykosidsäuremethylester gelingt durch dreimaliges Ausschütteln mit Äther. Die kurzkettigen Fettsäuremethylester wurden gaschromatographisch an einer SP 1000-Säule getrennt und anhand ihrer Retentionszeiten identifiziert. Es konnten folgende kurzkettigen Fettsäuremethylester nachgewiesen werden:

Essigsäuremethylester	R_t	8 Min.
Isobuttersäuremethylester	R_t	11 Min.
Buttersäuremethylester	R_t	13 Min.
Isovaleriansäuremethylester oder/und Methyläthylelessigsäure- methylester	R_t	14 Min.
Valeriansäuremethylester	R_t	16 Min.
Capronsäuremethylester oder/und Tiglinsäuremethylester	R_t	20 Min.

Diese Zusammensetzung der kurzkettigen Fettsäuremethylester weicht nur geringfügig von der anderer Glykosidsäuren ab. Bei der von uns bearbeiteten Droge liegen auf Grund der Retentionszeiten im Gaschromatogramm möglicherweise die Isovaleriansäure und Methyläthylelessigsäure nebeneinander vor, was bereits bei anderen Glykoretinen nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise liegen auch die Capronsäure und Tiglinsäure nebeneinander in den genuinen Glykoretinen vor, was allerdings bisher noch nicht nachgewiesen werden konnte.

Mengenmäßig verhalten sich die gefundenen Fettsäuremethylester nach steigender Retentionszeit wie 4:0.5:0.2:3.7:0.4:10.

III. Isolierung der Glykosidsäuren

Zur Isolierung wurde der von den kurzkettigen Fettsäuren befreite Rückstand mit Aceton versetzt und das dabei gebildete Präzipitat abgetrennt. Dünnschichtchromatographisch (Fließmittel: Chloroform-Methanol-Wasser 65:25:4) (37) waren nach

dem Besprühen der Platte mit Rhodamin 6G/NaOH (8%) 1:1 im UV-Licht vier hellgelbe Flecke auf rosa Untergrund im R_f -Bereich von 0.3 - 0.5 nachzuweisen. Außerdem traten zwei hellblaue Flecke unterhalb der Laufmittelfront in Erscheinung (Abb. 8, S. 21). Nach dem dünnschichtchromatographischen Verhalten und der Anfärbbarkeit mit Rhodamin 6G/NaOH sollte es sich bei den vier hellgelben Flecken um Glykosidsäuren handeln. Die methanolische Harzfraction bestand demnach aus einem Glykosidharzgemisch. Von den vier Verbindungen lag diejenige mit dem niedrigsten R_f -Wert in Höhe des aus *Convolvulus microphyllus* isolierten Microphyllinsäuremethylesters. Die anderen Verbindungen hatten weniger hydrophile Eigenschaften. Zum Vergleich hiermit hat der aus *Ipomoea operculata* Mart. isolierte Operculinsäure-(Rhamnoconvolvulinsäure-)Methylester einen R_f -Wert von 0.05 (Abb. 8, S. 21).

Das chromatographische Verhalten läßt den Schluß zu, daß die isolierten Turpethum-Glykosidsäuren entweder einen geringeren Zuckeranteil besitzen, als die von KAZMAIER (25) und SCHWARTING (28) isolierten Säuren, was in Übereinstimmung mit den Befunden von OKABE et al. (24) wäre, oder daß sich der Zuckeranteil bevorzugt aus weniger hydrophilen Methylpentosen zusammensetzt.

Wir versuchten zunächst die einzelnen Verbindungen mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie zu isolieren, konnten aber keine Trennung der Substanzen erreichen. Auch Versuche, das Glykosidsäuremethylestergemisch über eine Kieselgelsäule zu trennen, brachten kein besseres Ergebnis. Außerdem beobachteten wir eine teilweise Zersetzung während der Chromatographie. Deshalb acetylierten wir die Mischung mit Pyridin/Essigsäureanhydrid, indem wir über Nacht bei Zimmertemperatur stehen ließen und anschließend noch drei Stunden unter Rückfluß erhitzen. Die auf Raumtemperatur abgekühlte, dickflüssige Lösung wurde auf Eis gegossen und mit Chloroform extrahiert. Das acetylierte Glykosidsäuregemisch untersuchten wir in verschiedenen Fließmitteln auf Fertigplatten (Merck) und selbstgestrichenen Kieselgelplatten.

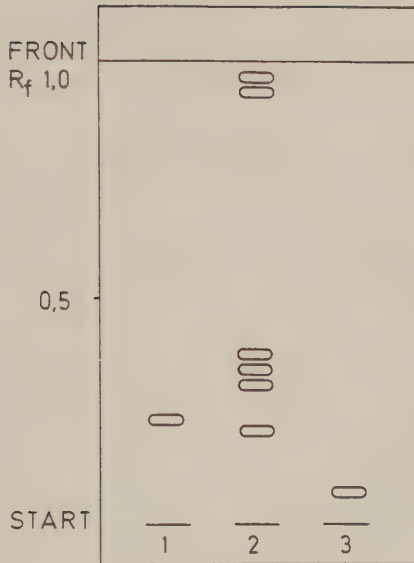


Abb. 8

Dünnschichtchromatographie der Glykosidsäuremethylestermischung

1 = Microphyllinsäuremethylester

2 = Glykosidsäuremethylester von *Ipomoea turpethum*

3 = Operculinsäuremethylester (Rhamnoconvolvulinsäuremethylester)

Kieselgelfertigplatte HF₂₅₄ Fa. Merck

Chloroform-Methanol-Wasser (65:25:4)

Rhodamin 6G/NaOH

UV

Im Fließmittel Cyclohexan - Isopropanol 2:1 erhielten wir zwei im UV-Licht hellgelb fluoreszierende Hauptflecke. Mit Hilfe der Kieselgelsäulenchromatographie konnten wir die Acetate, die dünnschichtchromatographisch gut trennbar waren, allerdings nicht in Form sauberer Reinfractionen erhalten. Auch ein vorangegangener Reinigungsversuch der Glykoxidsäuremethylester durch Perforation mit Äthylacetat blieb ohne Erfolg. Wir reinigten daher unser Acetatgemisch über eine Aluminiumoxidsäule, Aktivitätsstufe I, und verwendeten anschließend eine Kieselgelfertigsäule der Fa. Merck, Größe C, wobei als inertes Treibgas (2 atü) Stickstoff verwendet wurde. Wir lösten dazu das Acetatgemisch in wenig Cyclohexan-Isopropanol 2:1, eluierten mit dem gleichen Fließmittel und fraktionierten jeweils ca. 20 ml. Dadurch konnten wir die zwei Acetateverbindungen, die wir als A und B bezeichneten, trennen. Bei der anschließenden dünnschichtchromatographischen Untersuchung enthielten die Fraktionen 37 - 64 eine Substanz vom R_f -Wert ca. 0.4 (A), die Fraktionen 67 - 143 eine zweite Substanz vom R_f -Wert ca. 0.3 (B). Da noch geringe Verunreinigungen zu erkennen waren, wurden die vereinigten Fraktionen zur weiteren Reinigung über eine Kieselgelfertigsäule B der Fa. Merck gegeben. Die beiden Verbindungen waren jetzt dünnschichtchromatographisch rein.

Im gleichen Arbeitsgang erhielten wir nach Abtrennung der Acetate aus der Säule eine kristalline Verbindung vom Schmelzpunkt $223 - 224^{\circ}\text{C}$. Sie konnte als m-Inosithexaacetat identifiziert werden (Abb. 9).

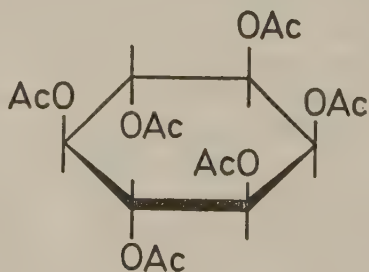


Abb. 9

m-Inosithexaacetat

Die CH-Werte und die Acetylgruppenbestimmung waren mit den Literaturangaben im Einklang.

Als Reservestoffe speichern die Convolvulaceen in der Regel Stärke in sehr großen Mengen. Aus Jalapenknollen konnte bisher nur Mannit(1) isoliert werden. Inosit ist damit erstmals bei den Convolvulaceen nachgewiesen worden.

IV. Aufklärung der Strukturen der Hydroxyfettsäuren der Turpethumglykoside

Die dünn-schichtchromatographisch reinen Fraktionen wurden nun zur Bestimmung der Aglykone und der Zucker zuerst mit NaOCH_3 entacetyliert und anschließend mit 1N-Schwefelsäure auf dem Wasserbad über Nacht hydrolysiert. Die auf Zimmertemperatur abgekühlten und mit etwas Wasser verdünnten Lösungen wurden mehrmals mit Äther ausgeschüttelt. Die mit BaCO_3 neutralisierten, wässrigen Phasen verwendeten wir für die Zuckeranalysen. Nachdem die vereinigten Ätherphasen mit Na_2SO_4 getrocknet und anschließend mit Diazomethan (38) methyliert waren, konnten die hierbei entstandenen Fettsäuremethylester auf einer SP 1000-Säule, 2.5% auf Chromosorb G AW - DMCS 80 - 100 mesh, bei einem Gasdurchfluß von ca. 30 ml/Min. und einem Papiervorschub von 5 mm/Min. gaschromatographisch untersucht werden. Die Gaschromatographie der beiden Fraktionen A und B zeigte, daß jeweils ein Gemisch von mindestens sechs Fettsäuremethylestern vorlag. Das Gemisch der Fettsäuremethylester unterschied sich nur in quantitativer Hinsicht. Somit konnten die Fettsäuremethylester beider Fraktionen gemeinsam untersucht werden. Die Gaschromatogramme waren durch das Vorliegen von mindestens sechs Fettsäuremethylestern, vermutlich Hydroxyfettsäuren, charakterisiert. Damit war gleichzeitig gezeigt, daß die beiden über ihre Acetate getrennten, dünn-schichtchromatographisch reinen Glykosidsäuren in Wirklichkeit noch Gemische darstellten.

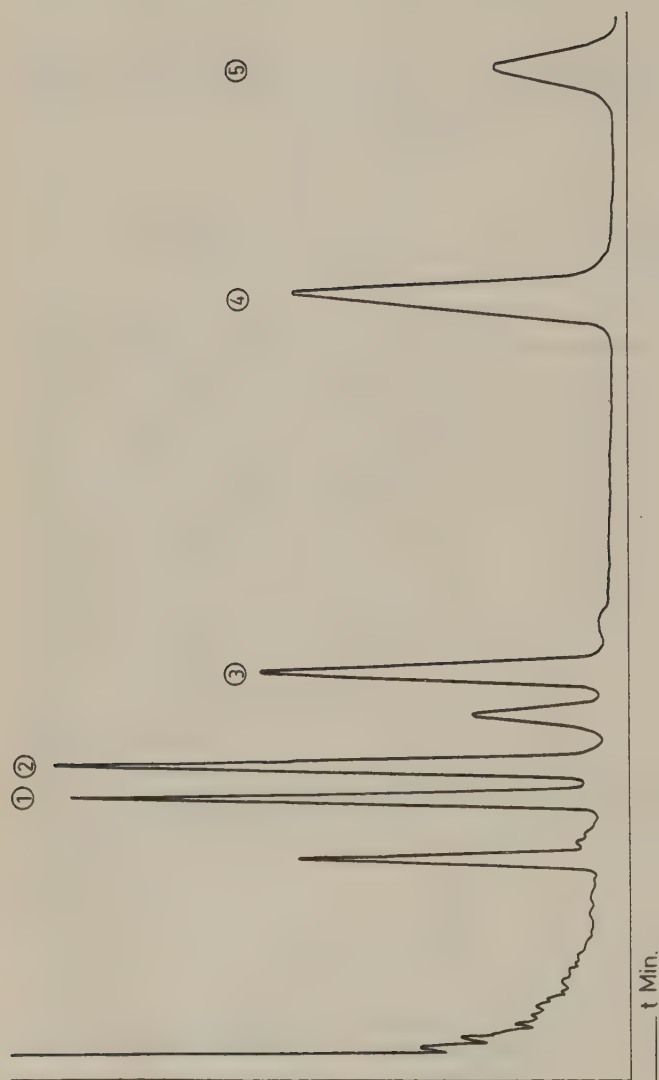


Abb. 10

Gaschromatogramm der Hydroxyfettsäuremethylester der Fraktionen A und B
Vermerk: Das Gaschromatogramm der Hydroxyfettsäuremethylester von Fraktion A und B unter-
scheidet sich nur in quantitativer Hinsicht.

Die Identifizierung versuchten wir zunächst durch Vergleich mit bekannten Mono- bzw. Dihydroxyfettsäuremethylestern. Auf diese Weise konnte Peak 1 (Abb. 10, S. 24) eindeutig als mit Jalapinolsäuremethylester identisch ermittelt werden. Der Peak 5 (Abb. 10) konnte mit dem bekannten Dihydroxyfettsäuremethylester (Operculinolsäuremethylester) als 3,12-Dihydroxyhexadecansäuremethylester identifiziert werden. Nach dem gaschromatographischen Verhalten bzw. ihren Retentionszeiten müßte es sich bei den Peaks 2, 3 und 4 (Abb. 10) jeweils um Dihydroxyfettsäuren mit etwa 14 - 16 Kohlenstoffatomen handeln. Das Vorliegen einer Monohydroxyfettsäure konnten wir mit ziemlicher Sicherheit ausschließen, da Monohydroxyfettsäuremethylester unter den angegebenen Versuchsbedingungen Retentionszeiten kürzer als 12 Min. haben müßten. Allerdings war auch das Vorliegen einer Dihydroxypentadecansäure von der Biosynthese her (39) nicht ganz auszuschließen. Die Identifizierung aufgrund der Retentionszeiten allein war deshalb nicht möglich, da einmal biosynthetisch ansich ungeradzahlige Fettsäuren in Frage kommen und zum anderen die Stellung der Hydroxylgruppen in der Kette sehr variiert.

Wie aus den Tab. 2, S. 7 und Tab. 3, S.8, hervorgeht, gibt es Fettsäuren mit Hydroxylgruppen in 3,7,11 und 12-Stellung vom Carboxylende aus gerechnet. Die Kettenlänge, sowie Anzahl und Stellung der Hydroxylgruppen mußten daher durch andere Methoden ermittelt werden.

Die Hydroxyfettsäuremethylester wurden zunächst dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel im Fließmittel Äther-Petroläther (3:7) (40) getrennt und mit Pyranin (3-Hydroxy-pyren-5,8,10-trisulfonsaures Natrium) als Nachweisreagenz sichtbar gemacht. Sie erscheinen mit diesem Indikator unter dem UV-Licht als hellblaue Flecke auf grünblauem Grund. Eine noch bessere Trennung auf dem Chromatogramm erzielten wir im Fließmittel Äthylacetat-Chloroform (5:1). Hier konnten wir im R_f -Bereich von 0.7 - 0.95 drei Hauptzonen und eine weitere Zone bei R_f 0.6 nachweisen (Abb. 11, S. 26).

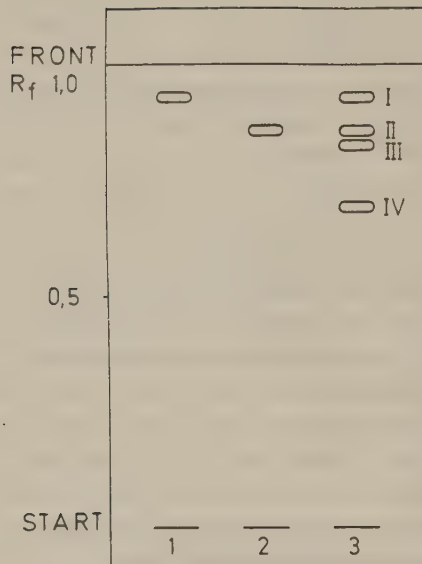


Abb. 11

Dünnschichtchromatogramm der Hydroxyfettsäuremethylester

- 1 = 11-Hydroxypalmitinsäuremethylester (Jalapinolsäuremethylester)
2 = 3,12-Dihydroxyhexadecansäuremethylester (Operculinolsäuremethylester)
3 = Hydroxyfettsäuremethylestergemisch

Kieselgelfertigplatte HF₂₅₄ Fa. Merck

Äthylacetat-Chloroform (5:1)

Pyraninlösung

UV

Wie aus dem Chromatogramm zu ersehen ist, stimmte der R_f -Wert des Jalapinolsäuremethylesters mit der Zone I und der des 3,12-Dihydroxypalmitinsäuremethylesters mit der Zone II gut überein. Bei den beiden anderen Zonen (III und IV) kann man aufgrund des R_f -Bereichs auf das Vorliegen von Dihydroxyfettsäuremethylestern schließen, denn methylierte Hydroxyfettsäuren werden in dem angegebenen System nach Gruppen in die Mono- und Dihydroxyfettsäuren getrennt. Wir versuchten nun die Säuremethylester durch präparative Dünnschichtchromatographie in dem beschriebenen Fließmittelsystem zu isolieren und nach dem Eluieren bei tiefer Temperatur (-20°C) kristallin zu erhalten. Dies gelang uns nur bei der Zone III, Smp. $49 - 50^{\circ}\text{C}$. Die anderen Zonen wurden gaschromatographisch bestimmt.

V. Spektrendiskussion der Hydroxyfettsäuren der Zonen I, II, III und IV

Die Strukturaufklärung der getrennten Hydroxyfettsäuren erfolgte durch IR-, ^1H - NMR- und Massenspektrometrie. Dünnschichtchromatographisch waren die Zonen I und II, gaschromatographisch Peak 1 und 5, mit dem Jalapinolsäure- bzw. Operculinolsäuremethylester identisch. Das IR-Spektrum des Jalapinolsäuremethylesters (28) wies folgende Banden auf: 3420 cm^{-1} (OH), 1735 cm^{-1} (Ester). Im Bereich von $1150 - 1350\text{ cm}^{-1}$ traten Banden auf, die für alkoholische OH-Gruppen an Kohlenwasserstoffketten typisch sind.

Zone I:

Das NMR-Spektrum (28) zeigte eine breite Absorption bei $\delta = 1.4$ ppm. Sie integrierte für 24 Methylenprotonen, was auf eine langkettige Kohlenwasserstoffkette hindeutet. Ein weiteres Signal bei $\delta = 2.29$ ppm integrierte für 2 Protonen und zeigt, daß die α -Stellung keine Substitution trägt. Durch das Auftreten des $\alpha\text{-CH}_2$ -Tripletts wird gezeigt, daß in β -Stellung ebenfalls keine Hydroxylgruppe vorhanden ist. Das Hydroxylsignal bei $\delta = 1.52$ ppm integrierte für ein Proton und zeigte, daß es sich um einen C_{16} Monohydroxyfettsäuremethylester handeln mußte, bei dem sich die Hydroxylgruppe zwischen den C-Atomen 4 und 15 befindet.

Für die genaue Lokalisierung der Hydroxylgruppe wurde das Massenspektrum herangezogen. Ein typischer und sehr charakteristischer Peak für Hydroxyfettsäuremethylester ist der bei m/e 74. Er zeigt wiederum an, daß die α -Stellung nicht substituiert war. Das Ion entsteht durch Bruch und gleichzeitige Wanderung des Wasserstoffatoms. Diese wichtigste mit Wasserstoffwanderung verbundene Fragmentierung ist die McLafferty-Umlagerung (41). Hierbei wandert ein γ -Wasserstoff über einen sechsgliedrigen Übergangszustand und unter Spaltung der α,β -Bindung, sog. β -Spaltung (Abb. 12).

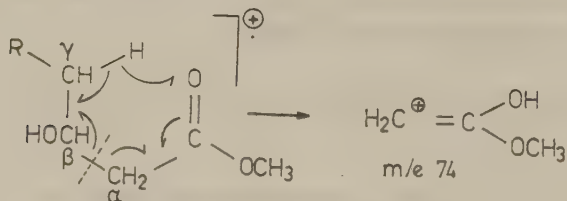


Abb. 12

McLafferty-Umlagerung

Es entstehen zusätzlich noch Ionen, die der Formel $\text{CH}_5\text{OCO}-(\text{CH}_2)_n^+$ entsprechen und als Peaks bei m/e 87, 101, 115, 129, 143 und 157 erschienen. Die für die Lokalisierung der Hydroxylgruppe wichtigsten Ionen m/e 71 und 185 entstehen aus Bindungsbrüchen in Nachbarschaft der COH-Gruppe.

Das Massenspektrum (Abb. 13, S. 29), unserer aus Zone I erhaltenen Substanz zeigte ebenfalls die angegebenen wichtigen Ionen bei m/e 71, 74, 101, 185 und 215. Eine Reihe von Peaks stammen von Kohlenwasserstoffionen durch einfachen Bindungsbruch und Umlagerung (m/e 41, 55, 69, 83). Das Massenspektrum war mit dem des Jalapionolsäuremethylesters (28) vollkommen identisch.

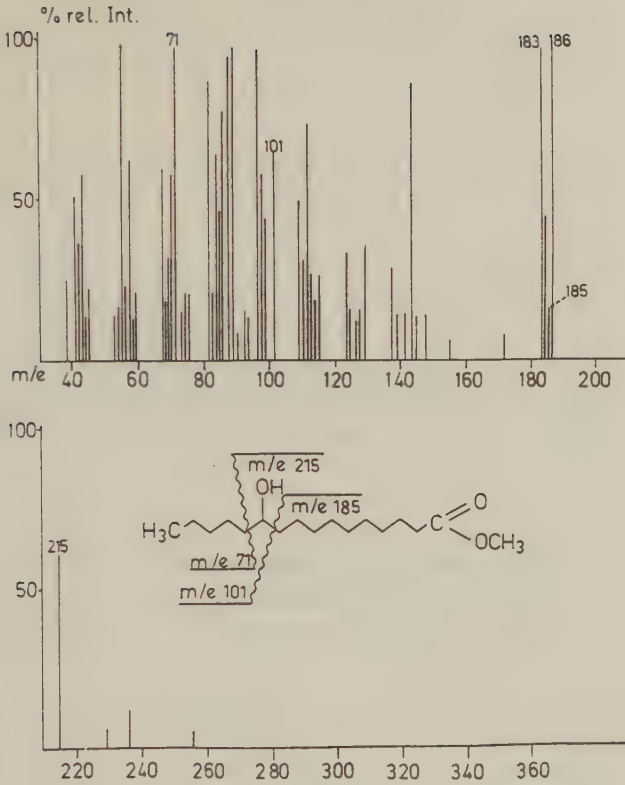


Abb. 13

Massenspektrum des Jalapinolsäuremethylesters

Zone II:

Das IR-Spektrum des Operculinolsäuremethylesters (25) zeigte OH-Banden bei 3340 und 3420 cm^{-1} und die Esterbande bei 1740 cm^{-1} . Durch die IR-Spektren beider bereits untersuchten Verbindungen war es allerdings nur möglich anzugeben, daß keine α -ständige Hydroxylgruppe vorhanden war.

Das NMR-Spektrum des Operculinolsäuremethylesters (25) zeigte eine Signalgruppe bei $\delta = 4.0$ ppm, die dem Proton am C_3 und eine weitere bei $\delta = 3.55$ ppm, die dem Proton am C_{12} zuzuordnen war. Erst das Massenspektrum des Fettsäuremethylesters und des silylierten Produktes ergab eindeutig die Stellung der beiden OH-Gruppen. Der Hauptpeak m/e 103 entstand durch Bindungsbruch zwischen dem eine Hydroxylgruppe tragenden C-Atom 3 und dem C-Atom 4. Der Peak m/e 74 war auch hier wie bei dem Jalapinolsäuremethylester vorhanden und zeigte, daß der Fettsäuremethylester am C_2 nicht substituiert war. Die weiteren Fragmente m/e 87 und m/e 57 stammen von Abbrüchen zwischen dem die zweite OH-Gruppe tragenden C_{12} und den ihm benachbarten C_{11} und C_{13} -Atomen. Alle anderen Peaks waren weniger charakteristisch und rühren von der Kohlenwasserstofffragmentierung her. Das Molekularion konnte allerdings nicht gefunden werden. Die genaue Bestimmung erfolgte ebenfalls massenspektrometrisch mit dem silylierten Produkt. Beim silylierten Produkt trat das Molekularion m/e 446 auf. Außerdem traten die am Trimethylsilyläther entstandenen Ionen m/e 57 und m/e 159, sowie m/e 389 und die durch Bindungsbruch am C_3 -Trimethylsilyläther gebildeten Ionen m/e 175 und m/e 373 auf, sodaß sich hieraus der 3,12-Dihydroxypalmitinsäuremethylester ableiten ließ.

Im Massenspektrum (Abb. 14, S. 31) der aus Zone II erhaltenen Verbindung traten ebenfalls die für einen β -Hydroxyfettsäuremethylester charakteristischen Peaks m/e 73, 74, sowie 103 auf. Die Ionen m/e 57, 87 und 245 zeigen, daß auch hier die zweite Hydroxylgruppe am C_{12} sitzt. Das Molekularion konnte nicht gefunden werden. Die grundlegenden Arbeiten über die Massenspektrometrie der Kohlenwasserstoffe und ihrer Derivate stammen von RYHAGE et al. (42).

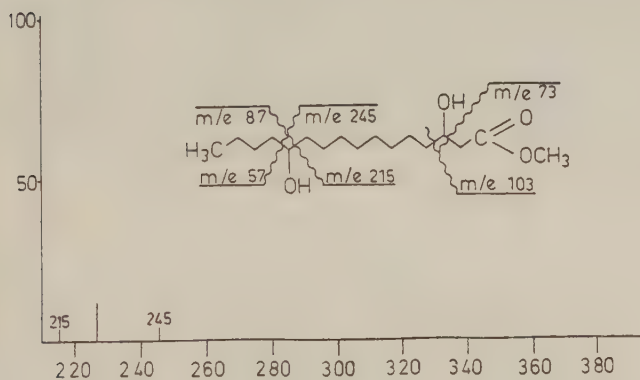
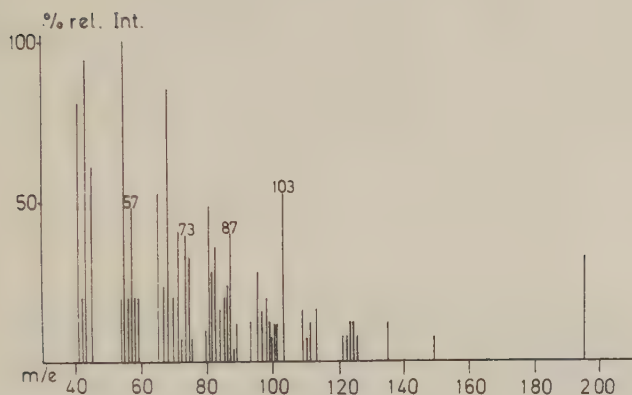


Abb. 14

Massenspektrum des 3,12-Di-OH-C₁₆-Fettsäuremethylesters

Im Massenspektrum (Abb. 15) der silylierten Verbindung ist der für einen β -Hydroxyfettsäuremethylester charakteristische Peak m/e 175 deutlich vorhanden. Durch die Peaks m/e 57, 159 und 389 wird die Stellung der zweiten Hydroxylgruppe am C_{12} bestimmt. Außerdem wird durch die anderen Peaks die Kettenlänge von 16 Kohlenstoffatomen genau angegeben. Die auftretenden Peaks decken sich voll mit denen des authentischen Operculinolsäuremethylesters (25).

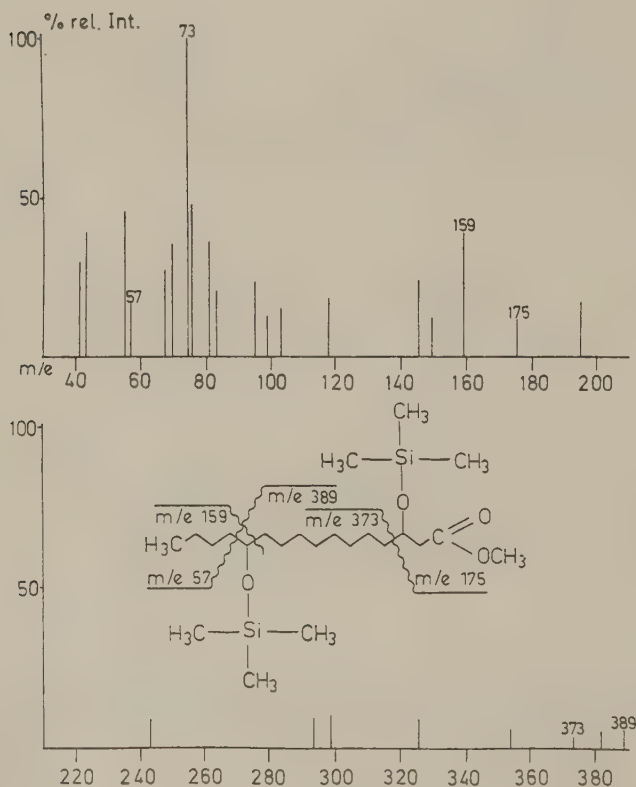


Abb. 15

Massenspektrum des silylierten 3,12-Di-OH- C_{16} -Fettsäuremethylester

Zone III:

Der Hydroxyfettsäuremethylester der Zone III, identisch mit dem Peak 4 des Gaschromatogramms, wies im IR-Spektrum folgende Banden auf: 3350 cm^{-1} (OH), 2900 cm^{-1} und 2850 cm^{-1} (CH), 1735 cm^{-1} (Ester). Das Fehlen der Banden im Bereich um 1650 cm^{-1} deutete darauf hin, daß es sich um einen gesättigten Fettsäuremethylester (25) handeln mußte. Die Banden im Bereich zwischen $1150 - 1350\text{ cm}^{-1}$ sind für alkoholische Gruppen an Kohlenstoffatomen typisch. Aus dem IR-Spektrum konnte abgeleitet werden, daß es sich um einen Hydroxyfettsäuremethylester handeln muß, der in α -Stellung nicht substituiert ist (Abb. 16).

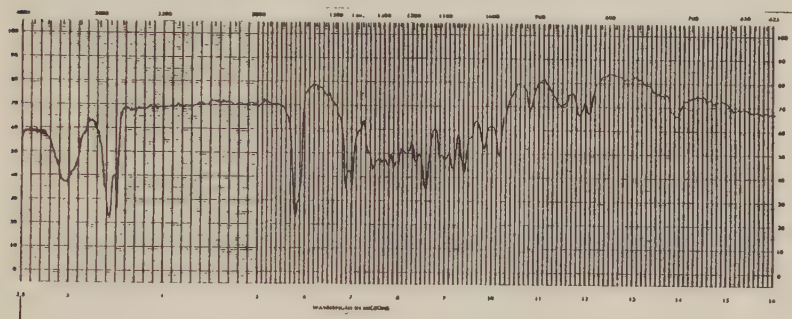


Abb. 16

IR-Spektrum des Hydroxyfettsäuremethylesters der Zone III

Im NMR-Spektrum zeigte das Signal bei $\delta = 0.98\text{ ppm}$ eine $\omega\text{-CH}_3$ -Gruppe einer langkettigen Kohlenwasserstoffkette (integriert für drei Protonen) an. Ein weiteres Signal bei $\delta = 1.4\text{ ppm}$, das für 20 Protonen integrierte, war für die CH_2 -Kette beweisend. Die Signale im Bereich von $\delta = 2.3 - 2.6\text{ ppm}$ waren den Protonen der α -ständigen CH_2 -Gruppe (integriert für vier Protonen), neben den beiden Protonen der Hydroxylgruppen zuzuordnen. Die Methylesterprotonen und die Protonen des Kohlenstoffatoms C_3 und C_{12} integrierten für insgesamt fünf Protonen. Sie liegen im Bereich von $\delta = 3.5 - 3.9\text{ ppm}$. Alle Signale stimmten exakt mit denjenigen, die von HOPKINS et al. (43,44) und von REHM (11) für Hydroxyfettsäuren angegeben wurden, überein (Abb.17, S. 34).

Die Zuordnung lautet:

ppm	Gruppe
0.9	- CH ₃
1.3	- CH ₂ (Kette)
2.3	- CH ₂ (α-CH ₂)
3.6	- CH (CH ₂ OH-Gruppe in der Kette)
3.7	- CH ₃ (des Methylesters)

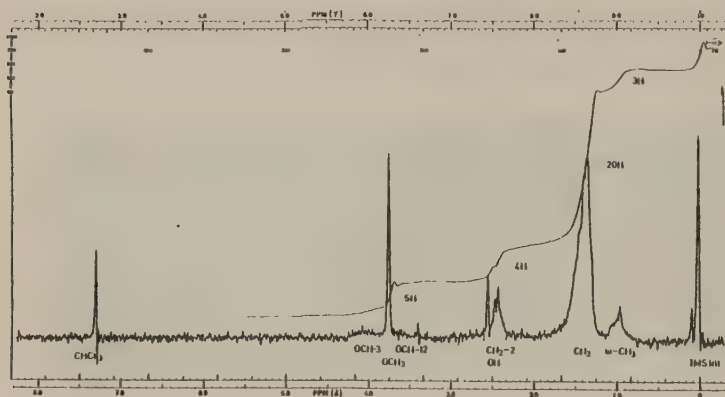
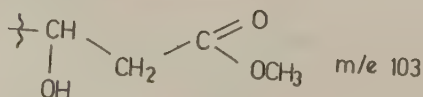


Abb. 17

NMR-Spektrum des Hydroxyfettsäuremethylesters der Zone III

Die Substanz der Zone III lieferte, ebenso wie die Operculinolsäure im Massenspektrum kein Molekularion. Der Peak m/e 103 muß durch Bindungsbruch am Kohlenstoffatom, das die Hydroxylgruppe trägt, entstanden sein und ist charakteristisch für einen β -Hydroxyfettsäuremethylester.



Durch den Peak m/e 74 konnte bewiesen werden, daß die α -Stellung nicht substituiert ist. Die Ionen m/e 43 und m/e 245 mußten durch Fragmentierung zwischen dem Kohlenstoffatom, das die zweite Hydroxylgruppe trägt, und den beiden benachbarten

Kohlenstoffatomen hervorgerufen worden sein. Außerdem folgte hieraus die Kettenlänge von 15 Kohlenstoffatomen. Der Peak m/e 73 war durch Bindungsabbrüche sowohl zwischen C_2 und C_3 , als auch zwischen C_{11} und C_{12} entstanden. Die OH-Gruppen müssen demnach die Positionen C_3 und C_{12} einnehmen.

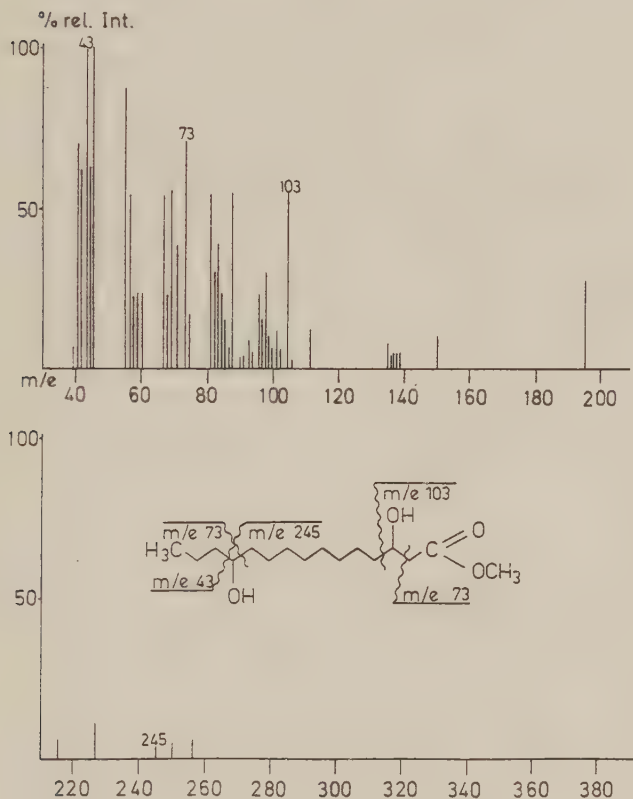


Abb. 18

Massenspektrum des 3,12-Di-OH-C₁₅-Fettsäuremethylesters

Das Massenspektrum (Abb. 19) der silylierten Verbindung beweist durch die Peaks m/e 175 und m/e 359, daß das C_3 -Atom eine Hydroxylgruppe trägt. Durch die Peaks m/e 43, 145 und 389 ist die Stellung der zweiten Hydroxylgruppe am C_{12} -Atom und die Kettenlänge von 15 Kohlenstoffatomen eindeutig festgelegt, sodaß es sich bei der Verbindung der Zone III um den 3,12-Dihydroxypentadecansäuremethylester handeln muß.

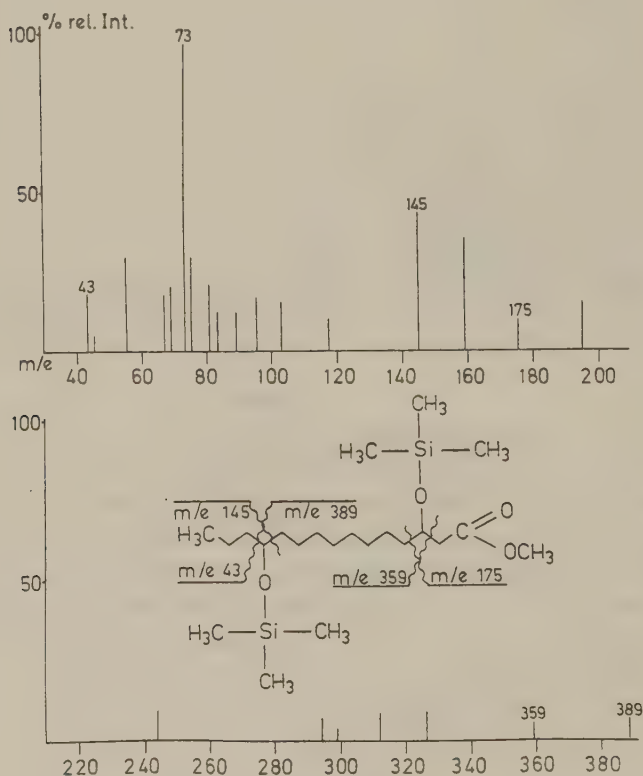


Abb. 19

Massenspektrum des silylierten 3,12-Di-OH- C_{15} -Fettsäuremethylesters

Zone IV:

Zone IV zeigte im Gaschromatogramm zwei deutliche Peaks, 2 und 3 (Abb. 10, S. 24). Im Massenspektrum (Abb. 20, S. 38) des Peaks 2 fehlten die für einen β -Hydroxyfettsäuremethylester charakteristischen und bereits beschriebenen Bruchstücke. Ein Molekularion konnte auch hier nicht gefunden werden. Die Ionen m/e 87 und 117 waren aber für das Vorliegen eines γ -Hydroxyfettsäuremethylesters beweisend. Daß es sich bei dieser Verbindung ebenfalls um einen Dihydroxyfettsäuremethylester handeln mußte, zeigten die Peaks m/e 43, 73 und 245. Die Bestätigung und genaue Lokalisierung der Hydroxylgruppen erfolgte auch hier anhand der silylierten Verbindung. Durch den Peak m/e 189 konnte eindeutig bewiesen werden, daß ein γ -Hydroxyfettsäuremethylester vorgelegen haben mußte. Durch die Peaks m/e 43, 145, 345 und 389 war die zweite Hydroxylgruppe eindeutig am C₁₂ festgelegt. Bei einer Kettenlänge von 15 Kohlenstoffatomen handelte es sich bei Peak 2 um den 4,12-Dihydroxypentadecansäuremethylester (Abb. 20, S. 38).

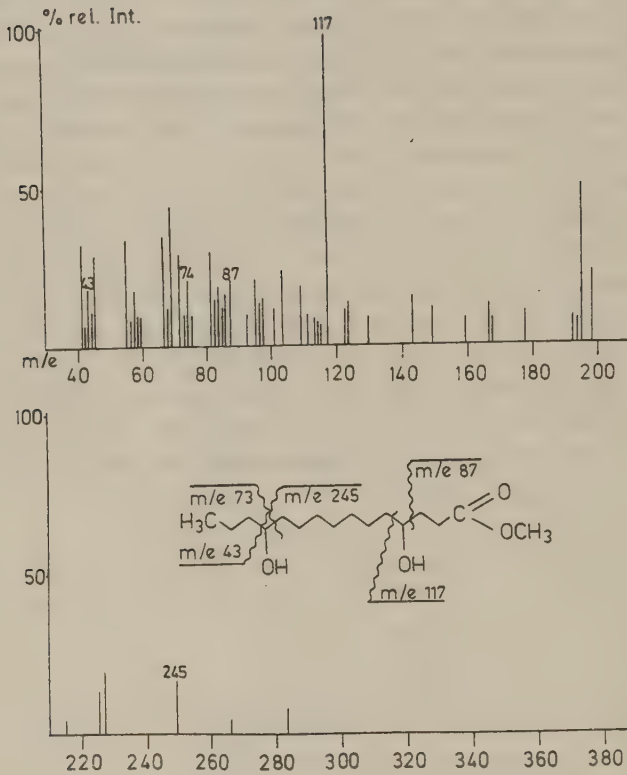


Abb. 20

Massenspektrum des 4,12-Di-OH-C₁₅-Fettsäuremethylesters

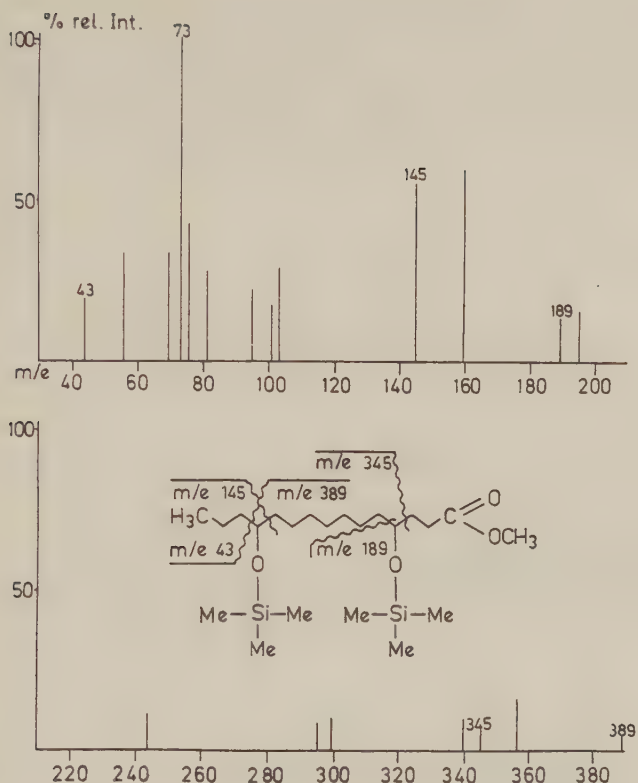


Abb. 21

Massenspektrum des silylierten 4,12-Di-OH-C₁₅-Fettsäuremethylesters

Das Massenspektrum (Abb. 22, S. 40) des Peaks 3 zeigte ebenfalls die für einen γ -Hydroxyfettsäuremethylester charakteristischen Peaks m/e 73, 74 und 117. Durch die anderen Ionen m/e 57, 87 und 245 konnte man ebenfalls auf einen Dihydroxyfettsäuremethylester, allerdings mit einer Kettenlänge von 16 Kohlenstoffatomen, schließen. Die Bestätigung und Lokalisierung der Hydroxylgruppen erfolgte auch hier mit Hilfe der

silylierten Verbindung. Das Massenspektrum (Abb. 23, S. 41) der silylierten Verbindung zeigte eindeutig das Vorhandensein eines γ -Hydroxyfettsäuremethylesters durch den Peak m/e 189. Die übrigen Peaks waren mit denen des silylierten Operculinolsäuremethylesters im Einklang, sodaß die untersuchte Verbindung 4,12-Dihydroxyhexadecansäuremethylester sein mußte.

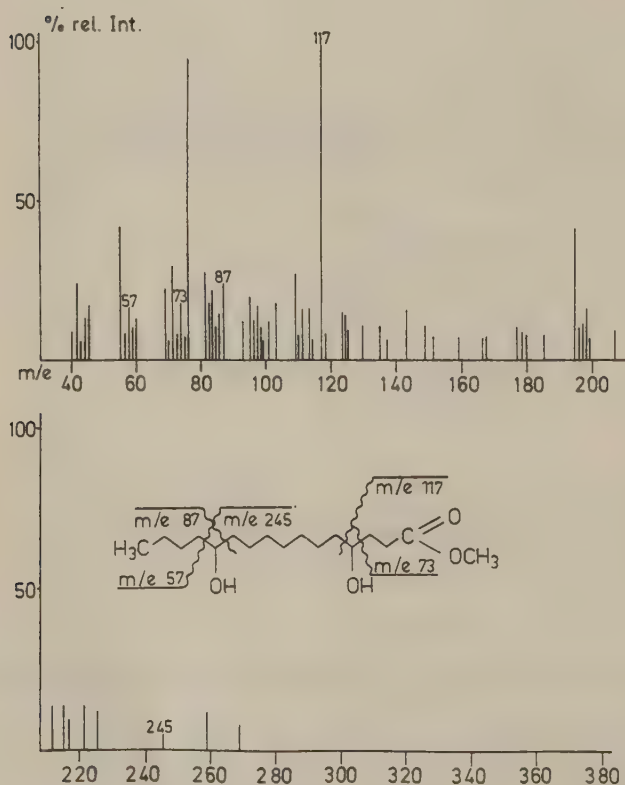


Abb. 22

Massenspektrum des 4,12-Di-OH-C₁₆-Fettsäuremethylesters

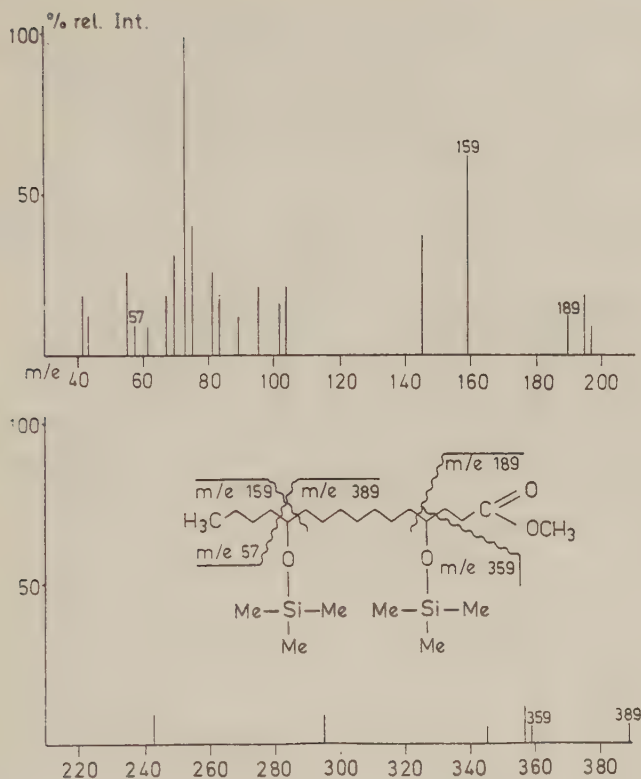


Abb. 23

Massenspektrum des silylierten 4,12-Di-OH-C₁₆-Fettsäuremethylesters

Nach diesen Untersuchungen waren in dem Glykosidharz folgende Hydroxyfettsäuren die Hauptsäuren:

11-Hydroxypalmitinsäure (Jalapinolsäure)

4,12-Dihydroxypentadecansäure

4,12-Dihydroxyhexadecansäure

3,12-Dihydroxypentadecansäure

3,12-Dihydroxyhexadecansäure (Operculinolsäure)

Die Jalapinolsäure, die bekannteste Monohydroxyfettsäure der Convolvulaceen, konnte schon aus 11 verschiedenen Convolvulaceendrogen isoliert werden. Auch die Operculinolsäure ist eine in dieser Familie bereits nachgewiesene Dihydroxyfettsäure. Die drei anderen Hydroxyfettsäuren wurden von uns erstmals in einer Convolvulaceendroge und damit auch im Pflanzenreich, nachgewiesen.

Wir schlagen für diese Hydroxyfettsäuren folgende Bezeichnungen vor:

3,12-Dihydroxypentadecansäure	=	Turpetholsäure A
4,12-Dihydroxypentadecansäure	=	Turpetholsäure B
4,12-Dihydroxyhexadecansäure	=	Turpetholsäure C

Da wir nur fünf Hauptpeaks des Gaschromatogramms näher untersucht haben, aber noch einige Peaks geringerer Intensität vorhanden waren, ist mit dem Vorliegen noch weiterer Fettsäuren in dieser Droge zu rechnen.

C. Synthesen

I. Synthese des Methylesters der natürlich vorkommenden

3,12-Dihydroxypentadecansäure

Von den im Turpethumharz aufgefundenen fünf Hydroxyfettsäuren sind bereits die Jalapinolsäure und die Operculinolsäure in anderen Convolvulaceendrogen nachgewiesen worden und in der Zwischenzeit auch synthetisiert worden. Die drei anderen Säuren, die 3,12-Dihydroxypentadecansäure (Turpetholsäure A), die 4,12-Dihydroxypentadecansäure (Turpetholsäure B) und die 4,12-Dihydroxyhexadecansäure (Turpetholsäure C) sind neu und bedurften noch des Strukturbeweises durch die Synthese.

Das allgemeine Prinzip der Synthese einer ω , β -Dihydroxyfettsäure besteht in einer Kondensation eines Alkylhalogenids mit dem Monoestersäurechlorid einer Dicarbonsäure zu einem Fettsäureketoester, der dann über eine Acetessigestersynthese um zwei Kohlenstoffatome verlängert wird. Der gebildete Diketoester wird dann durch anschließende Reduktion der Ketogruppen mit NaBH_4 in den gewünschten Dihydroxyfettsäuremethylester übergeführt. Für eine Dihydroxyfettsäure mit einer Hydroxygruppe in γ -Stellung muß abweichend von der oben beschriebenen allgemeinen Methode ein Ketosäurechlorid mit Bis-3,3-diäthoxypropylcadmium zum Diketoacetal kondensiert werden, wobei eine Ketogruppe in γ -Stellung entsteht. Das Diketoacetal kann nach dem Entfernen der Schutzgruppe durch Säure und anschließende milde Oxidation zur Diketosäure und durch Behandlung mit Diazomethan in den Diketofettsäuremethylester, mit einer Ketogruppe in γ -Stellung umgewandelt werden. Zuletzt wird mit NaBH_4 zum Dihydroxyfettsäuremethylester mit einer γ -ständigen Hydroxygruppe reduziert.

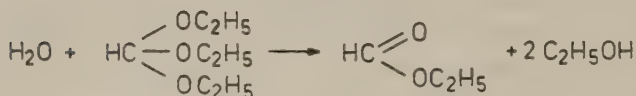
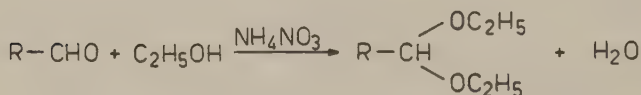
GRAF et al. (44) haben z.B. den 3,12-Dihydroxypalmitinsäure-(Operculinolsäure)-Methylester durch Kondensation von 10-Oxo-tetradecansäurechlorid mit Magnesiumacetessigester über den 10-Oxo-tetradecanoylacetessigester hergestellt. Mit Kaliummethylat wurde zum 3,12-Dioxohexadecansäuremethylester umgesetzt und dieser anschließend mit NaBH_4 zum 3,12-Dihydroxypalmitinsäuremethylester reduziert.

II. Syntheseweg für die Darstellung des 4,12-Dihydroxyhexadecansäuremethylesters

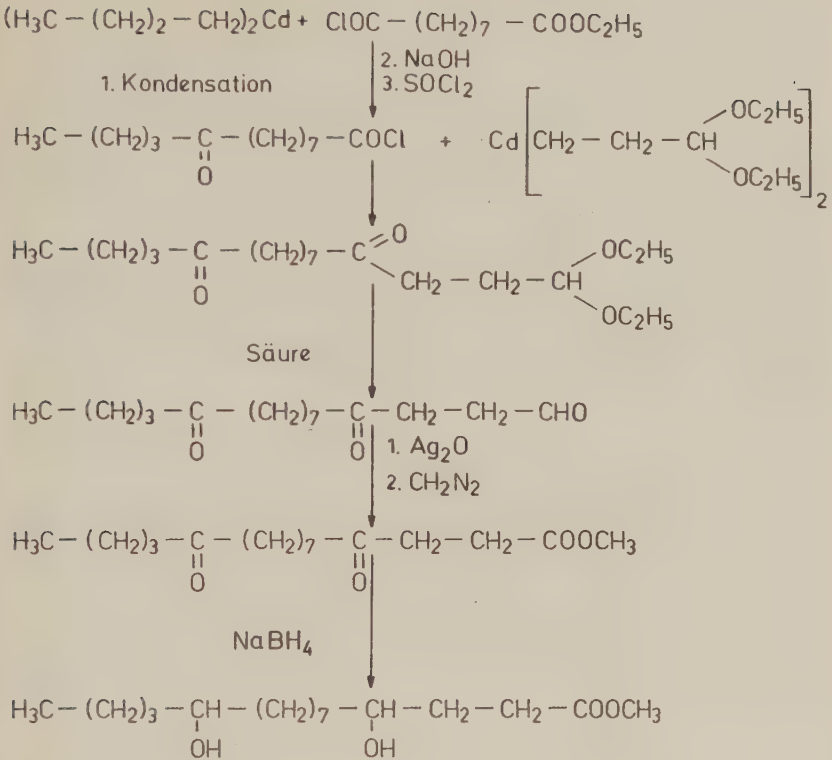
Im Anschluß an die vorangegangene Synthese sollten auch noch die 4,12-Dihydroxyhexadecansäure- bzw. 4,12-Dihydroxypentadecansäuremethylester synthetisiert werden. Da der Syntheseweg in Analogie der eben beschriebenen Methode nicht zu der gewünschten 4,12-Dihydroxy-Substitution führte, versuchten wir einen anderen Syntheseweg. Hierzu wurde der entsprechende 9-Ketotridecansäureäthylester analog der bereits beschriebenen Methode synthetisiert, anschließend dieser in das 9-Ketotridecansäurechlorid umgewandelt und dann mit Bis-3,3-diäthoxypropylcadmium kondensiert. Nach dem Entfernen der Schutzgruppe mit Säure konnte der dabei entstandene Aldehyd durch milde Oxidation in die Säure übergeführt werden. Veresterung mit Diazomethan und Reduktion der Carbonylgruppen mit NaBH_4 sollte dann zu den gewünschten Dihydroxyfettsäuremethylestern führen (Schemabild 4, S. 47).

Die erste Stufe der Synthese, die Umsetzung des n-Butylcadmiums mit dem Heptandicarbonsäurechloridmonoäthylester und die anschließende Umwandlung des entstandenen 9-Ketotridecansäureäthylesters in das Säurechlorid verlief wie erwartet. Der zweite Schritt, die Kondensation des Säurechlorids der 9-Ketotridecansäure mit dem Bis-3,3-diäthoxypropylcadmium war mit großen Schwierigkeiten verbunden. Die Darstellung des zur Herstellung des Organocadmiumderivates notwendigen β -Brompropionacetals nach einer Vorschrift von NEF (45) konnte mit nur sehr schlechten Ausbeuten durchgeführt werden. Das für die Synthese des Acetals erforderliche Bromwasserstoffgas wurde aus Tetralin (Tetrahydronaphthalin) und Brom (46) hergestellt. In einem zweiten Versuch wurde Bromwasserstoffgas der Fa. Merck verwendet. Das Gas wurde in eine mit Eiswasser gekühlte Lösung von abs. Äthanol eingeleitet und anschließend langsam in der Kälte Acrolein hinzugefügt. Nach einiger Zeit sollte sich das Acetal als Öl abscheiden. Die Ausbeuten waren trotz Variation der Versuchsbedingungen jedoch immer sehr gering oder die Reaktion fand überhaupt nicht statt. Auch eine von WOHL (47) für die Synthese des Diäthylacetals des Chloropropionaldehyds ausgearbeitete Methode ergab nur sehr schlechte Ausbeuten. Wir versuchten daher eine von COREY et al. (48) vorgeschlagene Methode,

mit der primäre und sekundäre Alkohole mit Hilfe von Pyridiniumchlorochromat oxidiert werden. Die Oxidation von Brompropanol zu Brompropanal blieb auch jetzt ohne Erfolg. Die Synthese der Acetale durch Reaktion des Orthoameisensäuretriäthylesters mit Aldehyden in Gegenwart von Ammoniumnitrat (49) war auf bromhaltige Alkohole nicht anwendbar.



Trotz der eben angegebenen Schwierigkeiten haben wir mit sehr geringen Acetalmengen den Versuch der Kondensation mit dem Oxosäureester unternommen. Das NMR-Spektrum des Reaktionsproduktes zeigte allerdings nicht das für ein Acetal typische Protonensignal. Nachdem nach vielen Versuchen mit immer wieder veränderten Reaktionsbedingungen keine Kondensation erfolgt war, wurden die Syntheseveruche an dieser Stelle abgebrochen.



Schemabild 4

Syntheseweg des 4,12-Dihydroxypalmitinsäuremethylesters

D. Qualitative und quantitative Zuckeranalyse

Zur qualitativen Zuckeranalyse wurde die wässrige Lösung der sauren Hydrolyse mit 1N-Schwefelsäure mit Bariumcarbonat neutralisiert und dann zur dünnschichtchromatographischen Untersuchung auf Monosaccharide im Fließmittel Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:2) verwendet. Als Detektionsmittel diente Anilinphthalatreagens (51). Von HOUGH et al. (52) werden Hydrolyse- und Neutralisationsmethoden angegeben, die sich für eine automatische Analyse eignen. Wir erhielten zwei Flecke, die nach ihren R_f -Werten den Zuckern Glucose und Rhamnose zugeordnet werden konnten (Abb. 24). Dieses Ergebnis stimmte mit den Angaben von AUTERHOFF et al. (23) überein.

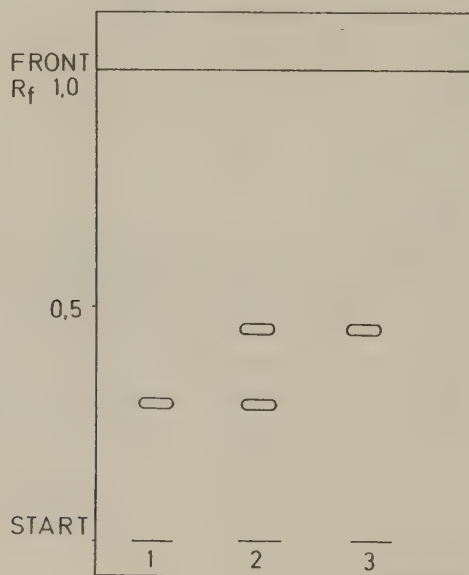


Abb. 24

Dünnschichtchromatographie der freien Zucker

- 1 = Glucose-Test
- 2 = Hydrolyseprodukte
- 3 = Rhamnose-Test

Kieselgelfertigplatte HF₂₅₄ Fa. Merck

Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:2)

Anilinphthalatreag.

Zur quantitativen Zuckerbestimmung im Mikromaßstab stehen eine Reihe von Methoden zur Verfügung. Sie sind in der Arbeit von KAZMAIER (25) näher erläutert. Wir wählten die Anthron-Schwefelsäure-Methode, da diese recht gute und leicht reproduzierbare Werte liefert (53). Bei dieser Methode soll die Rhamnosekonzentration zwischen 10 μg und 60 μg und die Glucosekonzentration zwischen 15 μg und 200 μg liegen. Die einzelnen Zucker des Zuckergemisches wurden auf einer Kieselgelfertigplatte der Fa. Merck, ohne Fluoreszenzindikator, im Fließmittel Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:2) entwickelt. Die Messung erfolgte nach dem Auskratzen der Flecke und anschließender Elution.

Die Ergebnisse aus vier Einzelmessungen ergaben für die Glucose die Extinktionswerte 0.640, 0.824, 1.045 und 1.208, gemessen am UV-VIS-Spectrophotometer bei 625 nm. Für die Rhamnose wurden die Extinktionswerte 0.497, 0.555, 0.624 und 0.836 abgelesen (Abb. 25, S. 50). Diese Werte entsprechen ziemlich genau einem Molverhältnis Glucose zu Rhamnose von 3:1, d.h. es muß ein Tetrasaccharid vorliegen. Obwohl jeweils Glykosidsäuregemische vorlagen, dürfte der Zuckeranteil in allen Komponenten gleich sein. Dieses Ergebnis steht mit dem dünnschichtchromatographischen Verhalten der Glykosidsäuremethylester im Einklang.

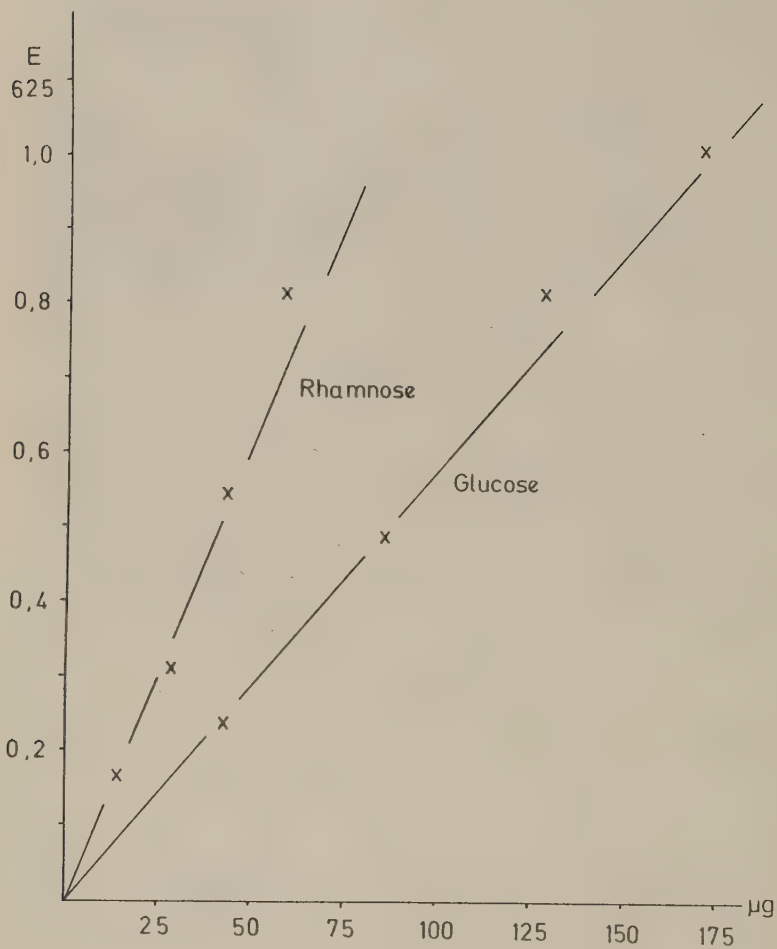


Abb. 25

Eichgerade von Glucose und Rhamnose nach der Anthron-Methode

Um Hinweise auf die Sequenz der Monosaccharide und ihre Verknüpfungsweise in dem Oligosaccharid zu erhalten, versuchten wir das Glykolipidgemisch partiell hydrolytisch abzubauen. Bei dieser Methode entstehen Di-Trisaccharide. Wie aus der Literatur bekannt ist (54), sind 1 → 6 Verknüpfungen stabiler als 1 → 4 Verknüpfungen, wenn man mit Mineralsäure unter milden Bedingungen hydrolysiert. Wir versuchten daher Glykosidsäuren mit nur einer Monosaccharideinheit zu erhalten, um dadurch festzustellen, welcher der beiden gefundenen Zucker, nämlich Rhamnose oder Glucose direkt an die Aglykone gebunden war. Wir hydrolysierten mit 70%iger Ameisensäure 30 Min. im Wasserbad nach einer von OKABE et al. (24) beschriebenen Methode. Das Hydrolysat wurde dünnschichtchromatographisch im Fließmittel Chloroform-Methanol-Wasser (7:3:1 Unterphase) aufgetrennt (Abb. 26, S. 53). Die einzelnen Hydrolyseprodukte (I, II, III, IV, V) wurden der Dünnschichtplatte entnommen, mit 1N-Schwefelsäure hydrolysiert und wiederum dünnschichtchromatographisch auf Zucker untersucht. Die Untersuchung der Hydrolyseprodukte I bis V (siehe Abb. 26, S. 53), die dünnschichtchromatographisch im Fließmittel Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:2) durchgeführt wurde, lieferte die folgenden Ergebnisse. Bei den Flecken I und II konnten wir jeweils nur die Glucose nachweisen, während bei den Flecken III, IV und V jeweils sowohl die Glucose, als auch die Rhamnose gut nachweisbar waren. Daraus ist zu schließen, daß es sich bei den Flecken I und II um Hydroxyfettsäure-0-glucoside handeln muß. Eine Glucose ist daher direkt an die jeweiligen Aglykone gebunden. Folgende Sequenzmöglichkeiten wären denkbar, vorausgesetzt, daß keine Verzweigungen in der Zuckerverknüpfung vorliegen:

Hydroxyfettsäure-0-Glucose-0-Glucose-0-Glucose-0-Rhamnose

oder

Hydroxyfettsäure-0-Glucose-0-Glucose-0-Rhamnose-0-Glucose

Nachdem bereits der partielle hydrolytische Abbau Hinweise auf die mögliche Zuckersequenz gebracht hatte, wurden die Glykosidsäuren permethyliert und nach Methanolyse versucht, die partiellen Monosaccharidmethyläther zu identifizieren. Bei der von PURDIE et al. (55) im Jahre 1903 ausgearbeiteten Permethylierung wird Methyljodid als Methylierungsmittel und Silberoxid als Katalysator verwendet. HAWORTH (56) verwendete Dimethylsulfat in Gegenwart von Natriumhydroxid. Bei beiden Verfahren müssen die Verbindungen meistens mehrmals hintereinander, am zweckmäßigsten wechselweise nach dem einen, dann nach dem anderen methyliert werden. Eine wesentliche Verbesserung brachte die Methode von KUHN et al. (57). Hier wird N,N-Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid als Lösungsmittel und Methyljodid oder Dimethylsulfat als Methylierungsmittel verwendet. Als basischer Katalysator dient Bariumhydroxid oder Bariumoxid. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß sie viel schneller abläuft und man mit sehr geringen Substanzmengen auskommt. Außerdem ist eine alkalibedingte Zersetzung weitgehend ausgeschaltet. Weitere Variationen mit Natriumhydrid (58) wurden ebenfalls zur Methylierung eingesetzt. Außerdem gibt es noch die Methode von HAKOMORI (59), die sich auf eine Arbeit von COREY et al. (60) bezieht. Wir bedienten uns der Methode nach HAKOMORI (59), wobei die entstandenen Produkte jeder Reaktionsstufe sowohl dünn-schichtchromatographisch, als auch mit Hilfe der IR-Spektroskopie überprüft wurden. Für die anschließende Hydrolyse wurden bereits verschiedene Säuren verwendet, wie z.B. Schwefelsäure (61), Salz-, Ameisen- oder Oxalsäure, auch Acetylbromid, methanolische Salzsäure und die Kiliani-Mischung (62), die aus Eisessig, Wasser und Salzsäure besteht. Wir hydrolysierten mit 1N-Schwefelsäure und neutralisierten mit Bariumcarbonat. Nach dem Filtrieren wurde mit NaBH_4 reduziert und mit Dowex H^+ neutralisiert. Die vollkommen getrocknete Substanz wurde anschließend mit Pyridin/Essigsäureanhydrid acetyliert und dann dünn-schichtchromatographisch und gaschromatographisch untersucht.

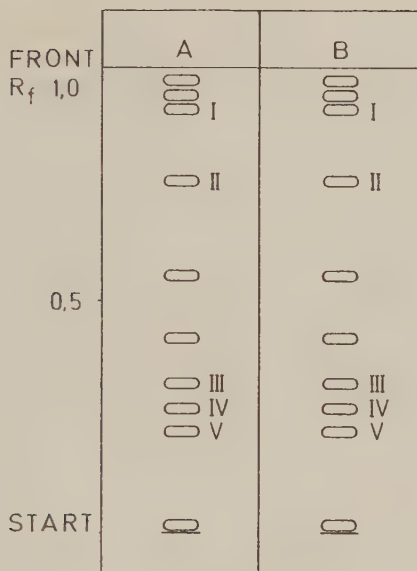


Abb. 26

DC der partiellen Hydrolyseprodukte

Kieselgelfertigplatte HF₂₅₄ Fa. Merck

Chloroform-Methanol-H₂O (7:3:1 Unterphase)

Det.: A = Rhodamin 6 G/NaOH

B = äthanolische Schwefelsäure

Methylierte Oligosaccharide können im Fließmittel Butanol-Äthanol-Wasser-Ammoniak (40:10:49:17) papierchromatographisch getrennt werden, wie BROWN et al. (63) gezeigt haben. Die Dünnschichtchromatographie zur Trennung von Methylzuckern wurde von HAY et al. (64) und von TSCHESCHE (65) beschrieben. Wir verwendeten Benzol-Methanol (98:2) zur dünn-schichtchromatographischen Reinigung der permethylierten Glykosidsäuremethylester und identifizierten die Zucker als Alditolacetate gaschromatographisch. Die Methanolyseprodukte von permethylierten Kohlenhydraten wurden bereits 1958 von McINNES et al. (66) gaschromatographisch

untersucht. Da auch diese Methode unter Umständen nicht immer eine genaue Identifizierung erlaubt, bedienten wir uns der Methode nach BJÖRNDAL et al. (67). Hierbei werden partiell methylierte Zucker mit NaBH_4 in die entsprechenden Alditole reduziert. Nach der Neutralisation mit Dowex H^+ und dem Entfernen der Borsäure mit Methanol wird mit Pyridin/Essigsäureanhydrid 1:1 bei 100°C acetyliert. Die so erhaltene Lösung wird über eine ECNSS M 3%-Säule bei 150°C isotherm gaschromatographiert. DARWILL et al. (68) entwickelten eine neue Säule, die zur kombinierten Gaschromatographie - Massenspektrometrie verwendet werden kann. Unser Gaschromatogramm der Methylzuckeralditolacetate zeigte drei Peaks (Abb. 27, S. 55). Ihre Identifizierung erfolgte über die Retentionszeiten. Als Bezugssubstanz für die relativen Retentionszeiten verwendeten wir 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucitol mit einer Retentionszeit von R_t : 6.3 Min.

Mit Sicherheit konnten 2,4,6-Tri-O-methyl-1,3-Di-O-acetyl-glucitol (Peak 3, Abb. 27, S. 55), rel. Retentionszeit R_t : 2.11 Min. und 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-1-O-acetyl-glucitol (Peak 2, Abb. 27) rel. Retentionszeit R_t : 6.3 Min. identifiziert werden. Bei Peak 1 (Abb. 27) mußte es sich nach der rel. Retentionszeit R_t : 0.68 Min. um ein Acetyl-rhamnitol handeln. Durch partielle Hydrolyse hatten wir bereits bewiesen, daß die Glucose direkt an das Aglykon gebunden sein muß. Nachdem das Zuckerverhältnis von Glucose-Rhamnose (3:1) bestimmt worden war und 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-1-O-acetyl-glucitol nachgewiesen worden war, deutete dies darauf hin, daß zumindest eine Glucose endständig vorgelegen haben muß. Das Vorhandensein des 2,4,6-Tri-O-methyl-1,3-Di-O-acetyl-glucitols zeigt eindeutig, daß eine Glucose 1 $\rightarrow$ 3 verknüpft sein muß. Außerdem konnte das Vorliegen einer Glucose mit 1 $\rightarrow$ 3 Verknüpfung gaschromatographisch mit Hilfe einer Vergleichssubstanz bewiesen werden. Eine zwischenglykosidische 1 $\rightarrow$ 3 Bindung ist bereits einmal bei einer anderen Convolvulaceendroge nachgewiesen worden (69). Aus dem Ergebnis der Permethylierung und der partiellen sauren Hydrolyse ist nur eine lineare Anordnung der Zucker möglich. Eine verzweigte Anordnung wie sie bereits bei den Pharbitinsäuren (33), bei der Operculinsäure (25), der



Abb. 27

Gaschromatogramm der Methylzuckeralditolacetate

Microphyllinsäure oder bei den Orizabinsäuren (28) gefunden wurde, kommt aufgrund der gefundenen Ergebnisse nicht in Frage. Demnach schlagen wir folgende Zuckerverknüpfung im Saccharidanteil vor (Abb. 28):

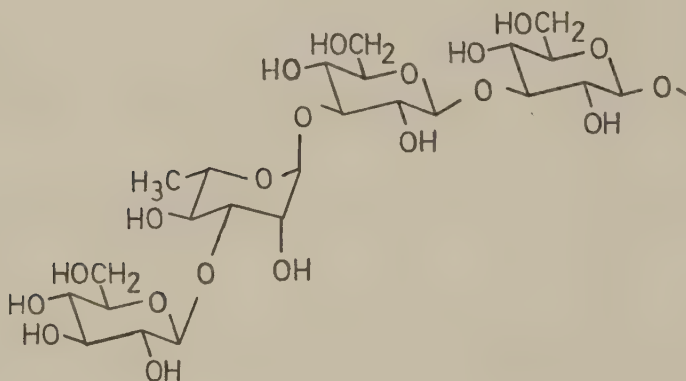


Abb. 28

Nach dem gaschromatographischen Verhalten der Alditolacetate könnte die Rhamnose auch mit derjenigen Glucose, die an das Aglykon gebunden ist, verknüpft sein. Da aber bei der partiellen Hydrolyse zuerst Verbindungen, die als Zuckerkomponente nur Glucose enthielten, nachgewiesen werden konnten, ist die vorher angegebene Zuckerverknüpfung die wahrscheinlichere. Die eingangs aufgrund der Dünnschichtchromatographie gemachte Hypothese, daß es sich bei den von uns untersuchten Verbindungen um Tetrasaccharide handeln müsse, stimmt ebenfalls mit den erhaltenen Ergebnissen überein.

Als Ergebnis unserer Untersuchungen machen wir für die Glykosidsäuren nachstehende Strukturvorschläge (Abb. 29, S. 57).

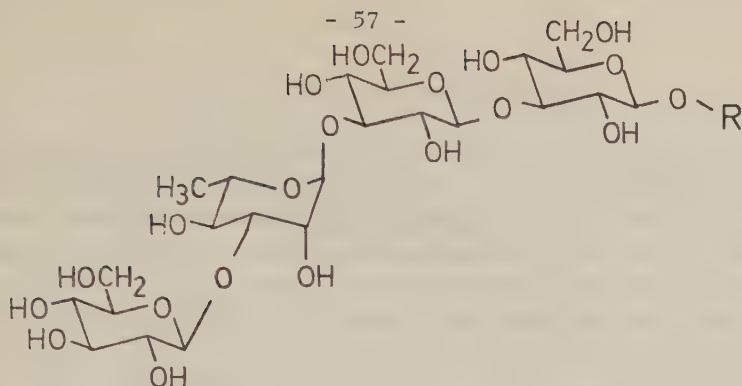


Abb. 29

R:	3,12-Dihydroxypentadecansäure	=	Turpethinsäure A
R:	4,12-Dihydroxypentadecansäure	=	Turpehtinsäure B
R:	4,12-Dihydroxyhexadecansäure	=	Turpethinsäure C
R:	3,12-Dihydroxyhexadecansäure	=	Turpethinsäure D
R:	11-Hydroxyhexadecansäure	=	Turpethinsäure E

E. Gaschromatographische Untersuchung der Hydroxyfettsäuren des Petroläther- und Ätherextraktes von *Ipomoea turpethum*

Der Petrolätherextrakt der Droge, der weniger als 1% Ausbeute der eingesetzten Harzmenge ergeben hatte und der Ätherextrakt, der ca. 5% der angesetzten Harzmenge ausmachte, wurden zur Untersuchung auf Hydroxyfettsäuren (Aglyka), wie bereits beschrieben, hydrolysiert und gaschromatographisch auf das Vorliegen von Fettsäuremethylestern untersucht. Nach den Literaturangaben (23) sollten in beiden Extrakten ebenfalls Glykosidsäuren enthalten sein. Wir konnten bei der Untersuchung beider Extrakte jeweils nur die Monohydroxyfettsäure Jalapinolsäure identifizieren. Die anderen Dihydroxyfettsäuren waren in beiden Extrakten nicht vorhanden. Als Zucker konnten in beiden Extrakten nur Glucose und die Rhamnose nachgewiesen werden. Nach den von uns durchgeführten Untersuchungen scheint es sich auch hier um Glycosidsäuregemische gehandelt zu haben. Unsere Untersuchungen sind mit denen von AUTERHOFF et al. (23) mit geringen Abweichungen der quantitativen Zusammensetzung in Übereinstimmung. Unser Ätherextrakt ergab eine wesentlich höhere Ausbeute als der Petrolätherextrakt.

Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Aus dem Alkoholextrakt der Wurzel von Ipomoea turpethum L. wurde ein Glykosidharz isoliert, das nach alkalischer Hydrolyse ein Gemisch von fünf Glykosidsäuren lieferte. Die Isolierung und Reinigung gelang über das Acetatgemisch. Die als Ester gebundenen, kurzkettigen Säuren wurden als Essig-, Isobutter-, Butter-, Isovalerian- und/oder Methyläthylessig-, Valerian-, Capron- und/oder Tiglin-Säure identifiziert.
2. Das entacetylierte Glykosidsäuremethylestergemisch ergab bei der Säurehydrolyse mindestens fünf Hydroxyfettsäuren und als Zuckerkomponenten nur Glucose und Rhamnose.
3. Durch kombinierte Gaschromatographie und Massenspektrometrie, sowie IR- und NMR-Spektrometrie konnten zwei Hydroxyfettsäuren als die bereits bekannte Jalapinolsäure (11-Hydroxypalmitinsäure) und Operculinolsäure (3,12-Dihydroxypalmitinsäure) identifiziert werden. Die drei anderen als Dihydroxyfettsäuren identifizierten Säuren wurden durch Massenspektrometrie als die bisher noch nicht bekannte 3,12-Dihydroxypentadecansäure, 4,12-Dihydroxypentadecansäure und 4,12-Dihydroxyhexadecansäure aufgeklärt. Davon konnte die 3,12-Dihydroxypentadecansäure durch Synthese in der Struktur bestätigt werden. Die neuen Hydroxyfettsäuren wurden als Turpetholsäure A, B und C bezeichnet.
4. Der Saccharidanteil wurde als ein Tetrasaccharid identifiziert, in dem die Glucose und Rhamnose im Verhältnis 3:1 gebunden sind. Durch partielle Hydrolyse, Permethylierung und Identifizierung der partiellen Methyläther konnte geklärt werden, daß die Glykosidsäuren, Turpethinsäuren A, B, C, D und E offenbar alle über einen gleich strukturierten Zuckeranteil verfügen und sich nur im Säureanteil unterscheiden. Nach dem Ergebnis der Permethylierung besitzt das Tetrasaccharid die Struktur eines O- β -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-O- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-O- β -D-glucopyranosids.

Die mengenmäßig in geringer Konzentration vorliegenden Glykosidharze des Petroläther- und Ätheranteils enthalten jeweils nur Jalapinolsäure. Als Zucker konnten Glucose und Rhamnose nachgewiesen werden.

EXPERIMENTELLER TEIL

A. Herkunft der Droge

Die Droge wurde als Resina Turpethi von der Firma H. Finzelberg's Nachfolger, Chemische Werke, Andernach/Rhein, bezogen.

B. Allgemeine Arbeitsmethoden

I. Dünnschichtchromatographie

1. Adsorbens

20 g Kieselgel HF₂₅₄ der Fa. Merck wurden mit 50 ml Wasser angerührt und auf fünf Glasplatten 12 x 20 cm ausgestrichen.

Die Platten wurden ca. 60 Min. bei 120°C aktiviert.

Zur Herstellung von Pyranin-Fluoreszenzplatten wurden 20 g Kieselgel HF₂₅₄ und 5.0 mg Pyranin (3-Hydroxypyren-5,8,10-trisulfonsaures Natrium) angerührt und die Platten dann wie üblich beschichtet.

2. Fließmittel

Glykosidsäuren

Chloroform-Methanol-Wasser (65:25:4)

Chloroform-Methanol-Wasser (7:3:1 Unterphase)

Isopropanol-Ammoniak 10% (2:1)

Glykosidsäureacetate

Benzol-Aceton (1:1)

Benzol-Methanol (9:1)

Cyclohexan-Isopropanol (2:1)

Fettsäuremethylester

Äther-Petroläther (3:7)

Äther-Petroläther (7:3)

Äthylacetat-Chloroform (5:1)

Permethylierte Glykosidsäuren

Benzol-Äthanol (8:2)

Benzol-Methanol (92:8)

Benzol-Aceton (2:1)

Zucker

n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:2)

Pyridin-Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser (36:36:7:21)

Aceton-Methanol-Chloroform-Wasser (10:4:2:1)

Methylzucker

Benzol-Methanol (97:3)

Benzol-Äthanol (8:2)

Zuckeracetate

Benzol-Methanol (96:4)

n-Butanol-Äthanol-Wasser (5:1:4)

3. Sprühreagentien

Glykosidsäuren

0.006%ige wässrige Rhodamin 6G-Lösung und 2N-Natronlauge (1/1 v/v). Diese Mischung wird stets frisch bereitet.

Nachbehandlung: Sofort im UV-Licht betrachten.

Glykosidsäureacetate

äthanolische Schwefelsäure (100 g Wasser, 100 g Schwefelsäure konz., 200 g Äthanol)

Nachbehandlung: Erhitzen im Trockenschrank auf 110°C.

Fettsäuren und Fettsäureester

Betrachten im UV-Licht (360 nm).

Zucker und Methylzucker

Anilinphthalatlösung (0.93 g Anilin und 1.66 g Phthalsäureanhydrid werden in 100 ml wassergesättigtem n-Butanol gelöst)

äthanolische Schwefelsäure

Nachbehandlung: Einige Minuten im Trockenschrank auf 110°C erhitzen.

II. Präparative Dünnschichtchromatographie

Die in ca. 1 ml Lösungsmittel gelöste Substanz wurde strichförmig auf Kieselgelfertigplatten der Fa. Merck oder auf selbstgestrichenen Kieselgelpplatten aufgetragen und in dem angegebenen Fließmittelsystem entwickelt. Nach dem Abdunsten

des Lösungsmittels wurden die Platten im UV-Licht betrachtet. Die fluoreszierenden Zonen wurden markiert, ausgekratzt und dreimal je 20 Min. mit dem entsprechenden Lösungsmittel (ca. 10 ml) durch Rühren am Magnetprüher extrahiert.

III. Säulenchromatographie

Kieselgelsäulen

Wir verwendeten Kieselgel HF₂₅₄ der Fa. Merck (0.05 - 0.2 mm), das mit dem jeweiligen Elutionsmittel in die Säule eingeschlammte wurde. Die Tropfgeschwindigkeit betrug 15 - 20 Tropfen/Min., bei einem Säulendurchmesser von 3 - 6 cm. Zur Trennung von Glykosidsäureacetaten wurden 100 g Kieselgel pro 1 g Substanz eingesetzt.

Aluminiumoxidsäulen

Ungefähr 200 g neutrales Aluminiumoxid der Aktivitätsstufe I wurde mit 6 ml Wasser verrieben. Das Aluminiumoxid wurde anschließend in die mit dem entsprechenden Elutionsmittel gefüllte Säule portionsweise hinzugegeben. Die Tropfgeschwindigkeit betrug 20 Tropfen/Min. bei einem Säulendurchmesser von 6 cm. Zur Filtration von Glykosidsäureacetaten wurden ca. 10 g des Rohproduktes auf die soeben beschriebene Säule aufgetragen.

Fertigsäulen

Es wurden die Fertigsäulen der Fa. Merck, Größe B Nr. 10401 und C Nr. 10402 verwendet. Als inertes Treibgas verwendeten wir Stickstoff mit einem Druck von 2 atü. Die Tropfgeschwindigkeit betrug 15 - 20 Tropfen/Min.

IV. Gaschromatographie

Modell: Perkin Elmer 900 B

Säule: spiralig gebogene Glassäule 1.8 m/4 mm

Trägergas: Spezial Argon der Fa. Linde, Reinheit 99.99%

Gasdurchfluß: 40 ml/Min.

Papiervorschub: 5 mm/Min.

Schreiber: Perkin Elmer 56, 2.5 mV

Detektor: FID

a) Fettsäure- und Hydroxyfettsäuremethylester

Säulenfüllmaterial: 2.5% SP 1000 auf Chromosorb G

AW - DMCS 80 - 100 mesh

Säulentemperatur: 90 - 190°C, linear programmiert mit
3°C/Min. (Fettsäuremethylester)

Säulentemperatur: 210 - 270°C, linear programmiert mit
1.5°C/Min. (Hydroxyfettsäuremethylester)

Einlaßtemperatur: 250°C

Empfindlichkeit: 1 x 512

Manifold: 260°C

Einspritzmenge: ca. 5 - 7 µl

b) Alditolacetate der partiell methylierten Zucker

Säulenfüllmaterial: ECNSS - M 3% (Silicon Cyanoäthyl)
auf Gaschrom Q 100 - 120 mesh

Temperaturen: Einlaß- und Detektortemperaturen: je 250°C

Säulentemperatur: 160 - 200°C, linear programmiert mit
1.5°C/Min.

C. Physikalische Untersuchungen

Mikroanalysen

Die Bestimmungen wurden im Institut für Pharmazeutische
Arzneimittellehre der Universität München durchgeführt.

Schmelzpunkte

Wir trockneten die Substanz in der Trockenpistole über Di-
phosphorpentoxid und bestimmten den Schmelzintervall auf
der Koflerbank der Fa. Reichert, Wien. Die angegebenen Wer-
te sind unkorrigiert.

IR-Spektren

Die IR-Spektren wurden im Institut für Pharmazeutische
Arzneimittellehre der Universität München mit dem Beckman-
Spektrophotometer IR-8 in KBr aufgenommen.

Protonen-NMR-Spektren

Die Protonen-NMR-Spektren wurden im Institut für Pharmazeu-
tische Arzneimittellehre der Universität München mit einem
Varian A-60 A Kernresonanzspektrometer aufgenommen. Als Lö-
sungsmittel diente Deuteriochloroform.

Massenspektren

Die Massenspektren wurden mit einem Varian MAT SM 1-A bei 70 eV und 300 μ A und einem AEI 30 bei 70 eV und 100 μ A im Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München aufgenommen.

Für die Ausführungen der Mikroanalysen, IR-Spektren, Protonen-NMR-Spektren und der Massenspektren danke ich Herrn O. Seligmann, Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München.

D. Gewinnung der Glykosidsäuren aus Ipomoea turpethum L.

I. Isolierung der Rohprodukte

Am Soxhlet wurden ca. 300 g grob gepulvertes und mit ca. 100 g Seesand verriebenes Harz zuerst mit 3 l Petroläther einen Tag, dann mit 3 l Äther zwei Tage und schließlich mit 3 l Methanol drei Tage extrahiert. Die einzelnen Extrakte wurden am Rotationsverdampfer bei ca. 40°C bis zur Trockne eingengt.

Ausbeute des Methanolextraktes: ca. 50 g.

Ausbeute des Ätherextraktes: ca. 8.0 g.

Ausbeute des Petrolätherextraktes: ca. 1.5 g.

II. Alkalische Hydrolyse mit Natriummethylatlösung

Eine Lösung von 2.0 g Methanolextrakt in 20 ml Methanol p.A. ließen wir nach Behandlung mit einigen Tropfen 1N-Natriummethylatlösung (pH 9) 12 Stdn. bei 4°C und anschließend 2 Stdn. bei Raumtemperatur stehen. Nach dem Ansäuern mit Essigsäure bzw. mit Salzsäure wurde die Lösung mit ungefähr 100 ml Wasser verdünnt und dann dreimal mit jeweils 50 ml Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten Ätherphasen, die die Fettsäuren in Form ihrer Methyl-ester enthalten, wurden am Rotationsverdampfer eingengt und gaschromatographisch auf kurzkettige Fettsäuren untersucht (siehe Seite 19). Die Methanol/Wasser-Phase wurde vollkommen zur Trockne eingengt.

Ausbeute: 0.6 g

III. Acetylierung

In 70 ml wasserfreiem Pyridin wurden 7.0 g des Glykosidsäuremethylestergemisches gelöst und dann 70 ml Essigsäureanhydrid hinzugefügt. Diese Lösung blieb über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Anschließend wurde noch ca. 2 Stdn. im siedenden Wasserbad erhitzt. Das so entstandene Reaktionsgemisch wurde unter sehr kräftigem Rühren mit einem elektrischen Rührer in ca. 1 l Eiswasser gegossen und das ausgefallene Acetat abgutscht. Ausbeute: ca. 5.0 g.

IV. Versuche zur Isolierung und Auftrennung des Glykosidharzes bzw. der Glykosidsäurederivate

1. Isolierungsversuch durch Ausfällen

Nach dem Waschen mit Wasser wurde ca. 25 g Glykosidharz der Alkoholfraktion in ca. 100 ml Äthanol gelöst und anschließend die Gerbstoffe mit Bleiacetatlösung gefällt. Das Präzipitat wurde filtriert und mit Schwefelwasserstoff behandelt. Nach dem erneuten Filtrieren wurde das gelblich braune Harz in wenig Äthanol gelöst und durch Fällern mit Äthylacetat sollte ein Glykosidsäuregemisch erhalten werden.

2. Säulenchromatographie des Glykosidsäuremethylestergemisches

Auf einer Kieselgelsäule (1800 g) mit einem Säulendurchmesser von 10 cm versuchten wir 20 g Glykosidsäuremethylestermischung im Fließmittel Chloroform-Methanol-Wasser (65:25:4) zu reinigen und zu trennen.

3. Dünnschichtchromatographische Isolierungs- und Auftrennungsversuche des Glykosidsäuremethylestergemisches

a) Kieselgelfertigplatten (Schichtdicke 0.5 mm) Fa. Merck Nr. 5744

Auf 6 Kieselgelfertigplatten - Fa. Merck Nr. 5744 - wurden ca. 300 mg im Fließmittel Chloroform-Methanol-Wasser (65:25:4) gelöstes Glykosidsäuremethylestergemisch aufgetragen und im gleichen Fließmittel entwickelt.

b) PSC-Fertigplatten (Schichtdicke 2 mm) Fa. Merck Nr. 5717
Auf 4 PSC-Fertigplatten - Fa. Merck - Nr. 5717 - wurden
ca. 600 mg Glykosidsäuremethylestergemisch, gelöst im
Fließmittel Chloroform-Methanol-Wasser (65:25:4), aufge-
tragen und im gleichen Fließmittel entwickelt.

c) selbst gestrichene Kieselgelplatten
Auf 10 selbst gestrichene Kieselgelplatten wurden ca.
100 mg im Fließmittel Chloroform-Methanol-Wasser(65:25:4)
gelöstes Glykosidsäuremethylestergemisch aufgetragen und
im gleichen Fließmittel entwickelt.

4. Säulenchromatographie des Glykosidsäureacetatgemisches

Auf eine Kieselgelsäule (250 g) mit einem Säulendurchmesser
von 4 cm wurde versucht, ca. 2.5 g Glykosidsäureacetatge-
misch im Fließmittel Cyclohexan-Isopropanol (2:1) zu iso-
lieren und aufzutrennen.

V. Mit Erfolg durchgeführte Isolierung und Reinigung des Glykosidsäureacetatgemisches

a) Reinigung über eine Aluminiumoxidsäule

5.0 g des Acetatgemisches wurden in ca. 5 ml Cyclohexan-
Isopropanol (2:1) aufgenommen und vorsichtig auf eine Alu-
miniumoxidsäule aufgetragen.

Säulendurchmesser: 6 cm

Adsorbens: Aluminiumoxid (Aktivitätsstufe II)

Fließmittel: Cyclohexan-Isopropanol (2:1)

Es wurden Fraktionen zu 20.0 ml aufgefangen, die Elution
dünnschichtchromatographisch überprüft und gleiche Frak-
tionen vereinigt.

Tropfgeschwindigkeit: 20 Tropfen/Min.

Ausbeute: 3.0 g

b) Isolierung der Glykosidsäureacetate

Auf eine Kieselgelfertigsäule der Fa. Merck wurden 1.0 g
in 6 ml Cyclohexan-Isopropanol (2:1) gelöstes Acetatge-
misch aufgetragen.

Säule: Fertigsäule Kieselgel 60 für die Flüssigkeits-
chromatographie - Größe C

Treibgas: Stickstoff 2 atü

Fließmittel: Cyclohexan-Isopropanol (2:1)

Tropfgeschwindigkeit: 16 Tropfen/Min.

Es wurden Fraktionen zu 20.0 ml aufgefangen und nach dünn-
schichtchromatographischer Überprüfung entsprechend ver-
einigt. Die beiden Hauptflecke konnten aus den Fraktionen
37 - 64 und 67 - 143 gewonnen werden.

Ausbeuten: 0.23 g (Fleck B R_f 0.3)

0.34 g (Fleck A R_f 0.4)

VI. Entacetylierung des Glykosidsäureacetatgemisches

100 mg des zu entacetylierenden Acetats wurden in 10 ml Me-
thanol p.A. gelöst und mit einigen Tropfen 1N-Natriummethylat-
lösung versetzt (pH 9). Auf diese Weise wurde das Gemisch der
Glykosidsäuremethylester erhalten.

Ausbeute: 70 mg.

IR (in KBr): 3500 - 3200 cm^{-1} (OH); 1700 cm^{-1} (CO) .

E. Chemische Untersuchungen

I. Hydrolysen

a) Hydrolyse der Glykosidsäuremethylester

50 mg Substanz wurden mit 2.0 ml 1N-Schwefelsäure 6 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wurde dreimal mit ca. 10 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroform-Phase wurde dreimal mit 20 ml Wasser gewaschen und anschließend mit Na_2SO_4 getrocknet. Die filtrierte Lösung wurde zur Trockne eingengt und für die Fettsäureanalyse verwendet. Die wässrige Lösung, in der die von den Aglykonen befreiten Zucker vorhanden waren, wurde unter Rühren am Magnetprüher mit feingepulvertem Bariumcarbonat neutralisiert. Nach dem Filtrieren und Einengen am Rotationsverdampfer wurde die Lösung dünn-schichtchromatographisch untersucht.

b) Hydrolyse des Glykosidsäureacetatgemisches

50 mg Acetat wurden mit 2.0 ml 1N-methanolischer Schwefelsäure unter Rückfluß erhitzt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach E/I/a).

II. Gaschromatographie des Hydroxyfettsäuremethylestergemisches

Genaue Angaben hierzu siehe B/IV/a), S. 62.

Retentionszeiten siehe E/IV, S. 68 u. 69.

III. Präparative Darstellung der Hydroxyfettsäuremethylester

Die Chloroformlösung nach E/I/a), in der die Hydroxyfettsäuren enthalten waren, wurde vollkommen zur Trockne eingengt und anschließend in wenig Äther gelöst und methyliert. Diazomethan wurde aus 5.0 g Nitroso-methyl-harnstoff in 150 ml Äther und 20 ml 60%iger Kaliumhydroxidlösung hergestellt. Das Ende der Methylierung ist an der Gelbfärbung, die durch überschüssiges Diazomethan verursacht wird, sichtbar. Nach Beendigung der Methylierung wurde die Ätherlösung zur Trockne eingengt und der verbleibende Rückstand in wenig Chloroform aufgenommen und dünn-schichtchromatographisch untersucht.

Zur präparativen Darstellung der Methylester hydrolysierten wir 200.0 mg des Acetatgemisches mit 1N-Schwefelsäure 6 Stdn., verdünnten mit etwas Wasser und schüttelten nach dem Erkalten mit Chloroform dreimal aus. Anschließend wurde wie oben beschrieben mit Diazomethan methyliert. Die Fettsäuremethylester wurden durch präparative Dünnschichtchromatographie über 12 x 20 cm Kieselgel-Pyranin-Platten im Fließmittel Äthylacetat-Chloroform (5:1) gereinigt. Bei einer Temperatur von -20°C konnten wir aus Äthylacetat-Chloroform (5:1) eine Substanz R_f -Wert ca. 0.8 kristallin erhalten.
Ausbeute: ca. 10 mg.

IV. Spektrendiskussion der Fettsäuremethylester

Zone I: Jalapinolsäuremethylester

(Abb. 11, S. 26, R_f 0.93)

(Abb. 10, S. 24, Peak 1 R_t 3 Min.)

MS: m/e (%) 71(95) 74(21) 101(63) 185(16) 215(58)

Zone II: Operculinolsäuremethylester

(Abb. 11, S. 26, R_f 0.85)

(Abb. 10, S. 24, Peak 5 R_t 13.5 Min.)

MS: m/e (%) 57(48) 73(40) 74(32) 87(40) 103(52)
245(5)

MS (silyl.Verbindung): m/e (%) 57(12) 159(39)
175(12) 373(4) 389(6)

Zone III: Turpetholsäuremethylester A

(Abb. 11, S. 26, R_f 0.82)

(Abb. 10, S. 24, Peak 4 R_t 10.5 Min.)

IR-Spektrometrie (in KBr): 3380 cm^{-1} (OH),
 1735 cm^{-1} (CO)

NMR-Spektrometrie (CDCl_3): $\delta = 0.98\text{ ppm}$ ($3\text{H}, \omega\text{-CH}_3$),
 $\delta = 1.40\text{ ppm}$ ($2\text{OH}, \text{-CH}_2$),
 $\delta = 2.30 - 2.60\text{ ppm}$
($4\text{H}, \alpha\text{-CH}_2$),
 $\delta = 3.50 - 3.90\text{ ppm}$
($5\text{H}, \text{CO}_2\text{CH}_3; \text{OCH-12}; \text{OCH-3}$)

MS: m/e (%) 43(98) 73(70) 103(54) 245(4)

MS (silyl.Verbindung): m/e (%) 43(18) 145(43)
175(11) 359(6) 389(6)

Zone IV: Turpetholsäuremethylester B

(Abb. 11, S. 26, R_f 0.69)

(Abb. 10, S. 24, Peak 2 R_t 3.8 Min.)

MS: m/e (%) 43(18) 73(16) 87(30) 117(98) 245(17)

MS (silyl.Verbindung): m/e (%) 43(19) 145(55)

189(13) 345(6) 389(5)

Turpetholsäuremethylester C (Abb.11,S.26, R_f 0.69)

(Abb. 10, S. 24, Peak 3 R_t 5.5 Min.)

MS: m/e (%) 57(15) 73(16) 87(21) 117(98) 245(5)

MS (silyl.Verbindung): m/e (%) 57(25) 159(61)

189(12) 359(5) 389(6)

V. Silylierung der Fettsäuremethylester

Für die Silylierung der Fettsäuremethylester wurden ca. 10 mg zu den in ca. 0.5 ml Pyridin gelösten Substanzen noch ca. 0.5 ml trockenes Pyridin zugesetzt. Anschließend wurden 0.5 ml Hexamethyldisilazan und 0.5 ml Trimethylchlorsilan hinzugefügt, ca. 30 Sekunden geschüttelt und dann 5 Min. bei Raumtemperatur stehengelassen. Die ausgefallenen Salze wurden abfiltriert, am Rotationsverdampfer eingengt und für die Massenspektrometrie verwendet.

VI. Qualitative Zuckeranalyse

Die nach E/I/a) erhaltenen Zucker wurden im Fließmittel n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:2) dünn-schichtchromatographisch auf Kieselgelfertigplatten der Fa. Merck ohne Fluoreszenzindikator untersucht. Glucose R_f = 0.3, Rhamnose R_f = 0.45.

VII. Quantitative Zuckerbestimmung nach der Anthronmethode

Mit 1N-Schwefelsäure wurden 50 mg Glykosidsäuremethylester wie bereits angegeben hydrolysiert. Die Hydrolyselösung wurde mit einigen ml Chloroform dreimal ausgeschüttelt, filtriert und zur Trockne eingengt. 20 mg, genau gewogen, wurden mit 5 ml Wasser verdünnt. Von dieser Lösung wurden 0.01 ml, 0.02 ml, 0.03 ml und 0.04 ml auf eine Kieselgelfertigplatte

Fa. Merck (ohne Fluoreszenzindikator) aufgetragen. Als Standardlösungen dienten Lösungen von 0.108 g Glucose-Monohydrat und 0.109 g Rhamnose-Monohydrat in 50.0 ml Wasser. Von diesen Lösungen wurden 0.01 ml, 0.02 ml, 0.03 ml und 0.04 ml auf einer Kieselgelfertigplatte Fa. Merck (ohne Fluoreszenzindikator) aufgetragen. An beiden Seiten der Platte wurden noch jeweils 0.1 ml zusätzlich aufgetragen. Nach dem Entwickeln der Platte in n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:2) wurden die Ränder abgeschnitten und mit äthanolischer Schwefelsäure nach B/3, S.60, besprüht, im Trockenschrank erhitzt und dann für die Bestimmung der R_F -Werte der Zuckerflecke verwendet. Jeder Zuckerfleck wurde von der Platte sorgfältig abgekratzt, mit 1 ml Wasser versetzt und auf dem "Whirlimixer" 1 Min. lang kräftig geschüttelt. Diese Lösungen wurden dann in einem Eisbad mit 5.0 ml (0.2%ige Anthronlösung in 95%iger Schwefelsäure) versetzt und wiederum am Whirlimixer 1 Min. kräftig geschüttelt. Anschließend wurden die Lösungen 16 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Lösungen in 1 cm Küvetten dekantiert und bei 625 nm im Hitachi-Spektralphotometer gegen eine Blindlösung gemessen.

T a b e l l e 4

Quantitative Zuckerbestimmung					
<u>Glucose</u>					
<u>Testlösung</u>			<u>Glykosidsäuren</u>		
ml	µg	E	ml	E	gef. (µg)
0.01	43	0.238	0.01	0.640	115
0.02	86	0.495	0.02	0.824	143
0.03	129	0.843	0.03	1.045	159
0.04	172	1.006	0.04	1.208	206
<u>Rhamnose</u>					
0.01	14	0.170	0.01	0.497	40
0.02	28	0.310	0.02	0.555	50
0.03	43	0.545	0.03	0.624	52
0.04	60	0.813	0.04	0.836	61

VIII. Partielle Hydrolyse des Glykolipidgemisches

Mit 70%iger Ameisensäure wurden ca. 50 mg des Glykosidsäuremethylestergemisches 30 Min. bei 90°C in einem Wasserbad erhitzt. Die auf Raumtemperatur abgekühlte Lösung wurde dann dreimal mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformphasen wurden vereinigt und mehrere Male mit Wasser gewaschen und anschließend mit Na₂SO₄ getrocknet und dann zur Trockne eingengt. Weiterverarbeitung nach E/I/a), S. 67.

IX. Permethylierung des Glykolipidgemisches

Vollkommen trockenes und mit Hilfe von Äther vom Paraffin befreites Natriumhydrid wurde in einem Kolben mit Calciumchloridrohr mit frisch destilliertem Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt und auf dem Ölbad ca. 45 Min. bei einer Temperatur von ca. 50°C erhitzt, bis eine grüne Lösung entstanden ist. Zu dieser Lösung gibt man ca. 50 mg Fettsäuremethylester, die unter Schütteln und Erwärmen auf ca. 60°C in 5 ml frisch destilliertem DMSO gelöst sind. Die so entstandene grüne, gallertige Masse wurde über Nacht am Magnetrührer gerührt. Nun wurden ca. 30 ml frisch destilliertes Methyljodid (CH₃J) portionsweise hinzugegeben, wobei die Farbe sofort in einen rötlich-braunen Farbton umschlug. Diese Mischung wurde nun noch zwei Stunden am Magnetrührer gerührt. Anschließend wurden ca. 200 ml Chloroform hinzugegeben und die Chloroformlösung mehrmals mit Wasser gewaschen. Die Chloroformphase wurde mit etwas Petroläther verdünnt und zur restlichen Entfernung des DMSO einige Male mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde mit Natriumsulfat getrocknet und die Lösung zur Trockne eingengt. Ausbeute ca. 40 mg. Das Permethylierungsprodukt wurde dünnschichtchromatographisch im Fließmittel Benzol-Methanol p.A. (98:2) gereinigt. Es waren mehrere Flecken nachweisbar.

X. Hydrolyse der Methylzucker

Das dünnschichtchromatographisch gereinigte Permethyläthergemisch wurde dann in 5 ml 1%iger Schwefelsäure 6 Stdn. am

Rückflußkühler im Wasserbad hydrolysiert. Die auf Raumtemperatur abgekühlte Lösung wurde am Magnetrührer mit feingepulvertem Bariumcarbonat neutralisiert, filtriert und zur Trockne eingeeengt.

XI. Darstellung der Methylzuckeralditolacetate

1. Reduktion mit Natriumborhydrid

Ungefähr 5 mg des aus den partiell methylierten Zuckern bestehenden Gemisches (siehe X., S. 71) wurden in 5 ml Wasser mit 5 mg Natriumborhydrid im Dunkeln bei Raumtemperatur 3 Stdn. stehen gelassen. Dann wurden die Na^+ -Ionen durch spatelweise Zugabe von Dowex 50 (H^+ -Form) unter kräftigem Mischen am Whirlimix entfernt, wobei eine starke Schaumentwicklung zu beobachten war. Anschließend wurde die Lösung filtriert und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt.

2. Entfernung der Borsäure

Die Substanz wurde mit jeweils 5 ml Methanol versetzt und der dabei gebildete Borsäuremethylester am Rotationsverdampfer bei 40°C entfernt. Dieser Vorgang wurde mehrere Male wiederholt, bis die Borsäure quantitativ entfernt war, da diese sonst bei der nachfolgenden Acetylierung stören würde.

3. Acetylierung

Die reduzierten Methylzuckeralditolacetate wurden in 5 ml wasserfreiem Pyridin gelöst und dann mit 5 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Die Lösung wurde 30 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt und nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur mit 10 ml Wasser versetzt und dann am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Nach dem Entfernen der Essigsäure durch Zugabe von Wasser und anschließendem Einengen am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand in ca. 10 ml Chloroform aufgenommen und dreimal mit Wasser ausgeschüttelt. Die Chloroformlösung wurde mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und wieder eingeeengt. Der Rückstand wurde in 0.2 ml Chloroform p.A. gelöst und gaschromatographisch untersucht.

F. Synthesen

I. Synthese des 3,12-Dihydroxypentadecansäuremethylesters

a) 10-Oxotridecansäureäthylester

Aus 2.45 g (0.1 Mol) Magnesiumspänen und 13.88 g (0.1 Mol) Brompropan in ca. 100 ml absolutem Äther stellten wir eine Grignard-Verbindung her. Zu der siedenden Lösung gaben wir 10.02 g (0.06 Mol) bis zur Gewichtskonstanz getrocknetes, wasserfreies Cadmiumchlorid hinzu, rührten eine Stunde und erhitzen unter Rückfluß. Nach der vollständigen Umwandlung der Grignard-Verbindung in den Cadmiumkomplex wurde innerhalb von 20 Min. 19.00 g (0.08 Mol) im gleichen Volumen absoluten Äther gelöstes Sebacinsäuremonoäthylesterchlorid der Fa. Merck unter Rühren und ohne zu erhitzen hinzugefügt. Anschließend wurde noch ca. 3 Stdn. unter Rühren und Rückfluß erhitzt. Nach Beendigung dieser Reaktion wurde mit soviel eiskalter 10%iger Schwefelsäure versetzt bis sich der gebildete Niederschlag gerade gelöst hatte. Die ätherische Schicht konnte somit abgetrennt und die wässrige noch einige Male mit Äther extrahiert werden. Die vereinigten Ätherextrakte wurden gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingengt. Ausbeute: 13.0 g (66.3% d.Th.).

b) 10-Oxotridecansäure

13.0 g (0.05 Mol) 10-Oxotridecansäuremethylester wurden aus einer Mischung aus jeweils 130 ml 20%iger Natronlauge und Methanol 2 Stdn. unter Rückfluß verseift. Der Alkohol wurde abdestilliert und nach dem Ansäuern mit 10%iger Schwefelsäure wurde einige Male mit Äther extrahiert und die Ätherphase nach dem Trocknen mit Natriumsulfat eingengt.

Ausbeute: 9.0 g (73.7% d.Th.).

Smp.: 59 - 60°C

IR-Spektrum (KBr): 3060 cm^{-1} (Carbonsäure), 2920 cm^{-1} und 2850 cm^{-1} (CH), 1710 cm^{-1} (Ketocarbonyl), 1680 cm^{-1} (Säurecarbonyl), 719 cm^{-1} (CH_2 -Def.)

NMR-Spektrum (DMSO): $\delta = 0.83$ ppm ($3\text{H}, \text{W-CH}_3$), $\delta = 1.1 - 1.6$ ppm ($14\text{H}, -\text{CH}_2$), $\delta = 2.05 - 2.4$ ppm ($6\text{H}, \text{CO-CH}_2$)

c) 10-Oxotridecansäurechlorid

9.0 g (0.04 Mol) 10-Oxotridecansäure wurden in 150 ml abs. Benzol gelöst und dann mit 6.75 ml Thionylchlorid versetzt. Dieser Ansatz blieb ca. 12 Stdn. bei Raumtemperatur unter Feuchtigkeitsausschluß stehen. Das Benzol wurde im Vakuum abdestilliert und, um das restliche Thionylchlorid zu entfernen, wurde noch mehrmals trockenes Benzol hinzugefügt und dieses dann wiederum ebenfalls im Vakuum abdestilliert.

Ausbeute: 8.5 g (95% d.Th.)

d) 10-Oxotridecanoylacetessigsäureäthylester

In einem mit Tropftrichter und Rückflußkühler mit Calciumchloridrohr versehenen Rundkolben wurden 1.03 g (0.04 Mol) Magnesiumspäne mit 2.5 ml abs. Äthanol übergossen und dann wenige Tropfen Tetrachlorkohlenstoff hinzugefügt. Sobald die Reaktion in Gang gekommen war, wurde ein Gemisch aus 5.6 g (0.04 Mol) Acetessigsäureäthylester, 5 ml abs. Äthanol und 20 ml abs. Äther unter kräftigem Rühren zugetropft, sodaß die Mischung lebhaft siedete. Anschließend wurde noch ca. 6 Stdn. unter Rückfluß erhitzt, bis nahezu alle Magnesiumspäne gelöst waren. Der mit Eiswasser abgekühlte Ansatz wurde mit 11.0 g (0.04 Mol) in 40 ml abs. Äther gelöstem 10-Oxotridecansäurechlorid unter Rühren versetzt und nach der vollständigen Zugabe des Säurechlorids noch 1 Stde. gerührt. Nach weiteren 12 Stdn. wurde unter Eiskühlung eine Mischung von 20 ml Eis und 1.25 ml konz. Schwefelsäure zugesetzt, die Ätherschicht abgetrennt und die wässrige Phase noch mehrere Male mit Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten Ätherextrakte wurden mit Wasser annähernd neutral gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und anschließend konnte der Rückstand, nachdem der Äther abdestilliert worden war, weiterverarbeitet werden.

Ausbeute: 14.0 g (95.8% d.Th.).

e) 3,12-Dioxo-pentadecansäuremethylester

14.7 g (0.04 Mol) 10-Oxotridecanoylacetessigsäureäthylester wurden mit 2.44 g (0.04 Mol) Kaliumhydroxid in 25 ml abs. Methanol über Nacht stehengelassen. Dann wurde auf 150 ml Eis und 1.35 ml konz. Schwefelsäure gegossen und

mit Äther extrahiert. Die Ätherextrakte wurden gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und der Äther im Vakuum abdestilliert.

Ausbeute: 10.6 g (72% d.Th.).

f) 3,12-Dihydroxypentadecansäuremethylester

1.0 g (0.002 Mol) 3,12-Dioxopentadecansäuremethylester wurden in 20 ml einer Mischung aus abs. Methanol und abs. Äther (2:1) gelöst und auf 0°C abgekühlt. Unter Eiskühlung wurden 0.25 g (0.0006 Mol) Natriumborhydrid portionsweise zugegeben und anschließend drei Stunden bei 0°C, dann noch eine halbe Stunde bei Raumtemperatur stehengelassen. Diese Mischung wurde dann mit Benzol und Äther verdünnt, mit Wasser gewaschen, getrocknet, das Lösungsmittelgemisch im Vakuum abdestilliert und der Rückstand bei 0°C aus Äther kristallisiert.

Ausbeute: 0.3 g (30% d.Th.).

Smp.: 49 - 50°C.

IR-Spektrum (KBr): 3180 cm^{-1} (OH), 2920 cm^{-1} und 2850 cm^{-1} (CH), 1710 cm^{-1} (CO-Ester), 719 cm^{-1} (CH_2).

NMR-Spektrum (CDCl_3): $\delta = 0.95$ ppm (3H, $\omega\text{-CH}_3$), $\delta = 1.2 - 1.6$ ppm (20H, $-\text{CH}_2$), $\delta = 2.4 - 2.6$ ppm (4H, $\alpha\text{-CH}_2$), $\delta = 3.5 - 3.9$ ppm (5H, CO_2CH_3 ; OCH-12 ; OCH-3)

II. Syntheseversuch des 4,12-Dihydroxyhexadecansäuremethylesters

a) 9-Oxo-tridecansäureäthylester

Aus 3.2 g (0.13 Mol) Magnesiumspänen und 18.18 g (0.13 Mol) Brombutan in ca. 100 ml abs. Äther stellten wir eine Grignard-Verbindung her. Zu der siedenden Lösung gaben wir 13.1 g (0.07 Mol) bis zur Gewichtskonstanz getrocknetes wasserfreies Cadmiumchlorid hinzu, rührten 1 Stde. und erhitzen unter Rückfluß. Nach der vollständigen Umwandlung der Grignard-Verbindung in den Cadmiumkomplex wurde innerhalb von 20 Min. 25 g (0.1 Mol) im gleichen Volumen abs. Äther gelöster 8-Chloroformyloctansäureäthylester der Fa. Merck unter Rühren und ohne zu Erhitzen hinzugefügt. Anschließend wurde noch ca. 3 Stdn. unter Rühren und Rückfluß erhitzt. Nach Beendigung dieser Reaktion wurde mit soviel eiskalter 10%iger Schwefelsäure versetzt, bis sich der gebildete Niederschlag gerade ge-

löst hatte. Die ätherische Schicht konnte somit abgetrennt und die wässrige noch einige Male mit Äther extrahiert werden. Die vereinigten Ätherextrakte wurden gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingeengt. Ausbeute: 22.1 g (66.9% d.Th.).

- b) Syntheseversuch des β -Brompropionaldehyddiäthylacetals
In 160 ml Äthanol wurde bei 0°C 200 g trockenes Bromwasserstoffgas gelöst. Zu 135 ml der erkalteten Lösung wurden bei 0°C 45 g Acrolein hinzugegeben. Nach 1 Stde. sollte sich ein Öl abscheiden, das mit festem Natriumbicarbonat behandelt und dann in ätherischer Lösung mit wässriger Natriumbicarbonatlösung gewaschen werden sollte. Das so erhaltene β -Brompropionaldehyddiäthylacetal sollte durch Destillation zwischen 80 und 90°C unter 20 mm Druck destilliert werden. Wir konnten jedoch diese Reaktion nicht oder nur mit minimalen Ausbeuten durchführen.

G. m-Inosithexaacetat

Nach Abtrennung der Glykosidsäureacetate aus der Fertigsäule (Seite 22) konnten wir im Nachlauf eine Verbindung vom Smp. 223 - 224°C kristallin erhalten und als m-Inosithexaacetat identifizieren.

$C_{18}H_{24}O_{12}$ (432.32)

Ber. C	49.9%	H 5.5%	CH_3CO	59.7%
Gef. C	49.7%	H 5.4%	CH_3CO	57.7%

H. Petroläther- und Ätherextrakt

a) Hydroxyfettsäuren

Die Hydroxyfettsäuren wurden als Methylester gaschromatographisch nach B/IV/a) bestimmt.

b) Qualitative Zuckeranalyse

Die nach E/I/a) erhaltenen Zucker wurden im Fließmittel n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:2) dünnschichtchromatographisch auf Kieselgelfertigplatten der Fa. Merck ohne Fluoreszenzindikator untersucht.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1) R. HEGNAUER, Chemotaxonomie der Pflanzen III, Birkhäuser Basel und Stuttgart, S. 547 (1964)
- 2) H. WAGNER, Nobel 25, Chemistry in bot.class. S. 235 (1973)
- 3) F.G. JARVIS u. M.J. JOHNSON, J.Am.chem.soc. 71, 4124 (1949)
- 4) A.P. TULLOCH, A. HILL u. J.F.T. SPENCER, Can.J.chem. 46, 3337 (1968)
- 5) A.P. TULLOCH, J.F.T. SPENCER u. M.H. DEINEMA, Can.J.chem. 46, 345 (1968)
- 6) T.W. ESDERS u. R.J. LIGHT, Lipid res. 13, 663 (1972)
- 7) R.U. LEMIEUX, G.A. THORN u. H.F. BAUER, Can.J.chem. 31, 1054 (1963)
- 8) G. LEGLER, Phytochemistry 4, 29 (1965)
- 9) T. KAWASAKI, H. OKABE u. I. NAKATSUKA, Chem.Pharm.Bull. 19, 1144 (1971)
- 10) C. MANNICH u. P. SCHUMANN, Arch.Pharm. 276/48, 211 (1938)
- 11) K. REHM, Dissertation München (1967)
- 12) P. POHL u. H. WAGNER, Fette, Seifen, Anstrichm. 74, 424 (1972)
- 13) E.J. SHELLARD, Planta Med. 9, 102, 141 u. 146 (1961)
- 14) M.I. GURR u. A.T. JAMES, Lipid Biochem., Chapman and Hall Ltd., London, S. 45 (1971)
- 15) C. HITCHCOCK u. B.W. NICHOLS, Plant Lipid Biochem., Academic Press London and New York, S. 96 (1971)
- 16) F.A. ABREU-GROBOIS, T.C. BILLYARD u. T.J. WALTON, Phytochemistry 16, 351 (1977)
- 17) A.J. MARKOVETZ, P.K. STUMPF u. S. HAMMARSTRÖM, Lipids 7, 159 (1972)
- 18) W.E. SHINE u. P.K. STUMPF, Archs Biochem.Biophys. 162, 147 (1974)
- 19) A.L. LEHNINGER, Biochemie, Verlag Chemie S. 369 (1970)
- 20) P. MAZLIAK, A.Rev.Pl.Physiol. 24, 287 (1973)
- 21) D. HUTTON u. P.K. STUMPF, Archs Biochem.Biophys. 142, 412 (1971)
- 22) E. VOTOCEK u. J. KASTNER, Zeitschr.f.Zuck.-Ind.Böhm. 31, 307 (1907)
- 23) H. AUTERHOFF u. H. DEMLEITNER, Arzneimittel-Forsch. 5, 402 (1955)
- 24) H. OKABE, N. KOSHITO, K. TANAKA u. T. KAWASAKI, Chem.Pharm. Bull. 19, 2394 (1971)
- 25) P. KAZMAIER, Dissertation München (1971)
- 26) M. HOEHNEL, Arch.Pharm. 234, 647 (1898)
- 27) N. KROMER, Arch.Pharm. 239, 373, 384 u. 389 (1901)
- 28) G. SCHWARTING, Dissertation München (1974)
- 29) J.P.S. SARIN, H.S. GARG, N.M. KHANNA u. M.M. DHAR, Phytochemistry 12, 2461 (1973)
- 30) S.N. KHANNA, P.C. GUPTA, Phytochemistry 6, 735 (1967)
- 31) A. LIPTAK, V.M. CHARI u. H. WAGNER, Veröffentlichung in Vorbereitung
- 32) S. SINGH u. B.E. STACEY, Phytochemistry 12, 1701 (1973)
- 33) H. OKABE u. T. KAWASAKI, Tetrahedron Lett. 36, 3123 (1970)
- 34) H.ZAHEER, The Wealth of India Vol. VII, Publications and Information Directorate New Delhi, S. 96 (1966)
- 35) Deutscher Arzneimittel-Codex, Govi-Verlag GmbH., Pharm.Verlag Frankfurt/Main (1972)
- 36) E.P. CLAUS u. V.E. TYLER jr., Pharmacognosy, Lea and Febiger Philadelphia, S. 236 (1965)

- 37) H. WAGNER, L. HÖRHAMMER u. P. WOLFF, Biochem. Zeitschr. 334, 12 (1961)
- 38) P. POHL, H. GLASL u. H. WAGNER, J. Chrom. 42, 75 (1969)
- 39) M. SUMPER, C. RIEPERTINGER u. F. LYNEN, FEBS Lett. 5, 45 (1969)
- 40) H.K. MANGOLD, J. Oil Chem. Soc. 38, 708 (1961)
- 41) F.W. McLAFFERTY, Anal. Chem. 28, 306 (1956)
- 42) R. RYHAGE u. E. STENHAGEN, Ark. Kemi. 15, 545 (1960)
- 43) C.Y. HOPKINS u. H.J. BERNSTEIN, Can. J. Chem. 37, 775 (1959)
- 44) C.Y. HOPKINS, Progr. Chem. Fats other Lipids 8, 215 (1966)
- 45) E. GRAF u. H. BÜHLE, Arch. Pharm. 30, 74, 628 (1974)
- 46) J.U. NEF, Annal. d. Chem. 335, 247 (1904)
- 47) A.I. VOGEL, Pract. Organic Analysis, III. Editio, Verlag Longmans, S. 182 (1959)
- 48) A. WOHL, Ber. d. dt. chem. Ges. 31, 1796 (1898)
- 49) E.J. COREY u. J.W. SUGGS, Tetrahedron Lett. 31, 2647 (1975)
- 50) Organikum, VEB Dt. Verlag d. Wiss. Berlin, S. 359 (1964)
- 51) S.M. PATRIDGE, Nature (London) 164, 443 (1949)
- 52) L. HOUGH, J.V.S. JONES u. P. WUSTEMAN, Carbohydrate Res. 21, 9 (1972)
- 53) S. MALLOV, J.M. McKIBBIN u. JANE SANDS ROBB, J. Biol. Chem. 201, 825 (1953)
- 54) I. DANISHEFSKY, R.L. WHISTLER u. F.A. BETTELHEIM, The Carbohydrates, Chemistry and Biochemistry Vol. II A, Editors E. Pigmann u. D. Horton, S. 401 (1970)
- 55) T. PURDIE u. J.C. IRVINE, J. Chem. Soc. 83, 1021 (1903)
- 56) W.N. HAWORTH, J. Chem. Soc. 107, 13 (1915)
- 57) R. KUHN, H. TRISCHMANN u. I. LÖW, Angew. Chem. 67, 32 (1955)
- 58) B. FLAHERTY, W.G. OVEREND u. N.R. WILLIAMS, J. Chem. Soc. 1, 398 (1966)
- 59) S. HAKOMORI, J. Biochem. 55, 205 (1964)
- 60) E.J. COREY u. M. CHAYKOVSKY, J. Amer. Chem. Soc. 84, 866 (1962)
- 61) P.J. GAREGG u. B. LINDBERG, Acta Chem. Scand. 14, 871 (1960)
- 62) H. KILIANI, Chem. Ber. 63, 2866 (1930)
- 63) F. BROWN, E.L. HIRST, L. HOUGH, J.K.N. JONES u. H. WADMAN, Nature 161, 720 (1948)
- 64) G.W. HAY, B.A. LEWIS u. F. SMITH, J. Chromatography 11, 479 (1963)
- 65) R. TSCHESCHE u. G. BALLE, Tetrahedron 19, 2323 (1963)
- 66) A. McINNES, D. BALL, F. COOPER u. C. BISHOP, J. Chromatography 1, 556 (1960)
- 67) H. BJÖRNDAL, B. LINDBERG u. S. SVENSON, Acta Chem. Scand. 21, 1801 (1967)
- 68) A.G. DARVILL, D.P. ROBERTS u. M.A. HALL, J. Chromatography 115, 319 (1975)
- 69) H. WAGNER u. P. KAZMAIER, Tetrahedron Lett. 35, 3233 (1971)

LEBENS LAUF

Gerald Karl Heinz W e n z e l

Geburtstag: 9. März 1945
Geburtsort: Aussig/Elbe
Eltern: Karl Wenzel, Bankkaufmann und
Dorothea Wenzel geb. Lehmann,
Bankkaufmann

Schulbildung:

Volksschule Echzell/Oberhessen,
von Ostern 1951 bis Ostern 1955
Realgymnasium Nidda/Oberhessen,
von Ostern 1955 bis 31. Dezember 1959
Rupprecht-Gymnasium München, vom 1. Januar 1960 bis
zur Reifeprüfung 1966

Berufsausbildung:

Apotheker-Praktikum vom 1. Oktober 1966 bis
30. September 1968,
Benno-Apotheke, Winthirplatz 8,
8000 München 19
Pharm.Vorexamen 11. September 1968
Studium der Pharmazie von 1969 bis 1972 an der
Ludwig-Maximilians-Universität
München
Pharm.Staatsexamen 12. September 1972
Approbation 29. November 1972
Wissenschaftliche Tätigkeit am 1. November 1972 begann ich
unter Leitung von Herrn Professor
Dr. H. Wagner am Institut für Phar-
mazeutische Arzneimittellehre der
Universität München mit der vorlie-
genden Arbeit. Seit 1. November 1973
Verw.d.Dienstgeschäfte eines wiss.
Assistenten

